

# DIPLOMARBEIT

## **DIE MOLEKULARE WIRKUNG AUSGEWÄHLTER NÄHRSTOFFE AUF DIE GENETIK DER KARDIOVASKULÄREN ERKRANKUNGEN**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Dr. Elisabeth Kastl-Killinger
Matrikel-Nummer:	a6900132
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften (A474)
Betreuer:	Prof. Dr. Jürgen König

Wien, im Mai 2010



*Widmung*

*Meinem Vater*



## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Jürgen König für die Betreuung dieser Diplomarbeit bedanken.

Weiters gilt mein Dank Dr. Roswitha Strommer und Mag. Susanne Reder, die mir hilfreich für Form und Wortwahl der Diplomarbeit zur Seite standen.



# **INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN</b>	<b>IV</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN</b>	<b>V</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung und fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen</b>	<b>3</b>
2.1 Entwicklung der modernen Molekularbiologie	3
2.2 Single Nukleotid Polymorphismus (SNP)	7
2.3 Linkage Disequilibrium: Die Korrelation unter SNPs	8
2.4 Das HapMap - Projekt	9
2.5 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Genetik	11
2.6 Genomweite Assoziationsstudien (GWA)	12
2.6.1 Überlegungen zu den Methoden von GWA	13
2.6.1.1 Phänotypen von CVD	14
2.6.1.2 Genotypisierende Plattformen	14
2.6.1.3 Qualitätskontrolle der Genotypisierung	15
2.6.1.4 Imputation	16
2.6.1.5 Studiendesign und statistische Power	16
2.6.1.6 Replikation	17
2.6.1.7 Fine Mapping und funktionelle Assays	18
2.7 Die koronare Herzkrankheit (KHK)	18
2.8 Copy Number Variation (CNV)	22
2.8.1 Definition	22
2.8.2 CNVs, die mit bekannten genetischen CVD assoziiert werden	23
2.9 Risikofaktoren kardiovaskulären Erkrankungen	25
2.9.1 Hypertonie	25
2.9.2 Adipositas	29
2.9.3 Metabolisches Syndrom	30
2.9.4 Diabetes mellitus TypII (DM II)	31
2.9.5 KHK und Diabetes	32

---

2.9.6	Cerebrovaskuläre Erkrankungen	33
2.9.7	Periphere arterielle Verschlusskrankung (PAVK)	33
2.9.8	Observationen in utero und im frühen Kindesalter	34
2.9.9	Epigenetische Mechanismen	35
<b>3</b>	<b>Das Gefäßendothel</b>	<b>37</b>
3.1	Stickoxid:	39
3.1.1	Acylierung	41
3.1.2	Intrazelluläre Calcium/Calmodulin Bindung	41
3.1.3	Phosphorylierung	42
3.1.4	S-Nitrosylierung	42
3.1.5	eNOS Expression	42
3.2	Prostacyclin	44
3.3	Endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (EDHF):	46
3.4	Endotheliale Dysfunktion	48
3.4.1	Entstehung der endothelialen Dysfunktion - Arteriosklerose	48
3.4.2	Bildung der Läsion am Gefäßendothel	50
3.5	Vaskuläre Verkalkung	51
<b>4</b>	<b>Biomarker (BM)</b>	<b>53</b>
4.1	Definition	53
4.2	Entdeckung von Biomarkern	53
4.3	Entwicklung von BM für CVD	54
4.4	Genetische Studien in Bezug auf BM:	55
4.5	Technische Überlegungen bei BM	57
4.6	C - reaktives Protein	58
4.7	Fibrinogen	61
4.8	Lp-PLA2 : Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2	64
4.9	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	64
4.10	BM in der Ernährungsepidemiologie	66
4.11	Es gibt verschiedene Gruppen an BM	68
4.11.1	Recovery BM	68
4.11.2	Prediktive BM	68
4.11.3	Konzentrations BM	69



---

4.11.4	Replacement BM	69
4.12	Verwendung	70
<b>5</b>	<b>Nutrigenomiks</b>	<b>73</b>
5.1	Was ist Nutrigenomiks	73
5.2	Grundsätze von Nutrigenomiks	73
5.3	Vorteile von Nutrigenomiks	74
5.4	Herausforderungen von Nutrigenomiks:	76
5.5	Transkriptomiks	77
5.6	Proteomiks	78
5.7	Metabolomiks	80
<b>6</b>	<b>Ernährung-Erkrankung genetische interaktionen</b>	<b>83</b>
6.1	Ernährung und CVD	87
6.2	CVD und Fette	88
6.2.1	Apolipoprotein E (ApoE)	92
6.2.2	Apolipoprotein A-V	97
6.2.3	Lipoproteinlipase	99
6.2.3.1	Biologie der Lipoprotein Lipase	100
6.2.3.2	LPL Expression Tiermodell	102
6.2.3.3	Polymorphismen LPL Gen	103
6.2.4	Cholesterinesterase Transport Protein (CETP)	104
6.2.4.1	Studien zu CETP	106
6.2.5	Neue Genloci, die Lipidspiegel und CVD beeinflussen	109
6.2.6	Genexpression durch Olivenöl	110
6.3	B-Vitamine, Homocystein und CVD	110
6.3.1	Folsäure	111
6.3.2	Riboflavin (B2)	115
6.4	Phytochemikalien und CVD	116
6.4.1	Polyphenole, Flavonoide	116
6.5	Antioxidantien	119
6.5.1	Der Begriff Antioxidans	119
6.5.2	Antioxidantien aus der Nahrung	120
6.5.3	Vitamin E	122

---

6.5.4	Vitamin C	124
6.5.5	Vitamin D	126
6.6	L-Arginin	130
6.6.1	Stoffwechselweg L-Arginin und ADMA (asymmetrisches dimethyliertes Arginin)	130
6.6.2	Mechanismen, durch die ADMA erhöht wird	133
6.6.3	Das L-Arginin Paradoxon	134
6.6.4	Studien in der letzten Zeit	137
<b>7</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>161</b>
<b>10</b>	<b>Summary</b>	<b>163</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>165</b>



**VERZEICHNIS DER TABELLEN**

Tabelle 1:	Genotypen spezifische Odds Ratio .....	19
Tabelle 2:	Vitale Funktionen des vaskulären Endothels.....	39
Tabelle 3:	Isoformen der NO-Synthasen .....	40
Tabelle 4:	Pathophysiologische Gleichgewichte .....	47
Tabelle 5:	modifiziert nach Ilyn 2004.....	55
Tabelle 6:	Plasmaspiegel des CRP .....	62
Tabelle 7	Faktoren, welche die Messung und Brauchbarkeit von BM zur Bestimmung von ernährungsspezifischen Auswirkungen im Körper beeinträchtigen können [Jenab 2009].....	68
Tabelle 8:	Liste der Kandidatengene, für die eine Assoziation bei verschiedenen Ernährungsformen gefunden worden ist.....	85
Tabelle 9:	Apolipoproteine im menschlichen Plasma [Sattler 2002] .....	93
Tabelle 10:	Die Lipasefamilie und ihre Mitglieder [Rip 2007] .....	100
Tabelle 11:	Der Effekt von Vitamin E und C in vitro, ex vivo und in vivoantioxidativen Wirkung [Kaliora 2006].....	122

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1:	Die Genese eines neuen SNP .....	9
Abbildung 2:	Korrelationsstruktur am 9p21 Locus .....	21
Abbildung 3:	Diallel- multiallelische CNV .....	24
Abbildung 4:	Graphische Darstellung Risikofaktoren .....	26
Abbildung 5:	Kardiovaskuläres Kontinuum .....	28
Abbildung 6:	Circulus viriosus des metabolischen Syndroms [Hanefeld 2007].	31
Abbildung 7:	Metabolische Gegebenheiten, die Diabetes charakterisieren, besonders Hyperglykämie, freie Fettsäuren und Insulinresistenz, sie provozieren Veränderungen in der Funktion und Struktur der Gefäße durch molekulare Mechanismen .....	32
Abbildung 8:	Regulation der Genexpression durch Epigenetische Prozesse .....	35
Abbildung 9:	Denkmuster für die Kontrolle der eNOS Gen-Expression Tai et al 2004 .....	44
Abbildung 10:	Biosynthese der Eikosanoide aus Arachidonsäure [Nilius 2001] ..	46
Abbildung 11:	Cardiovaskuläre Risikofaktoren .....	48
Abbildung 12:	Biomarker des akuten Koronarsyndroms .....	63
Abbildung 13:	Klassen von BM .....	69
Abbildung 14:	Integrierter Metabolismus .....	76
Abbildung 15:	Hochdurchsatzanalyse der DNA .....	84
Abbildung 16:	Genotyp-Umweltinteraktionen .....	86
Abbildung 17:	Die Rolle des CETP beim Plasmalipid Transport .....	105
Abbildung 18:	Homocystein Metabolismus. ....	113
Abbildung 19:	Quellen und Metabolismus des Arginins .....	130
Abbildung 20:	Effekte verminderter Arginin Verfügbarkeit .....	132
Abbildung 21:	Biochemischer Stoffwechselweg der Synthese .....	133
Abbildung 22:	L-Arginin ist das Substrat von NOS .....	135
Abbildung 23:	Studiendesign L-Arginin .....	138

*„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“*

**VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN**

ADMA	asymmetrisches Dimethyl-Arginin
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2
BM	Biomarker
BMI	Body Mass Index
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
DDHA	Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase
DM II	Diabetes mellitus Typ II
EDHF	endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor
	endothelium-derived-hyperpolarizing-factor
eNOS	endotheliale NOS
GPCR)	G Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HCY	Homocystein
HDL-C	High density Lipoprotein Cholesterin
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IHD	Ischämische Herzerkrankungen
IHD	Ischaemic heart disease
IL	Interleukin
IP	I Prostazyklinrezeptor
KHK	koronare Herzkrankheit
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Konstante

---

LDL-C	Low density Lipoprotein Cholesterin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MI	Myokardinfarkt
miRNA	Micro Ribonukleinsäuren
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase.
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PCR ^	Polymerase Ketten Reaktion
PGD <sub>2</sub>	Prostglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin Stickstoffmonoxid (NO)
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PRMT	Protein Arginine <i>N</i> -Methyltransferase
rTPA	rekombinante Tissue Plasminogen Aktivator
SRA	Serum resistant associated (Gen)
TG	Triglyceride
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tRNA	Transkriptions RNA
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	vascular Endothelial Growth Factor
VGEF	Vascular endothelian growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein





## **1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG**

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) sind in der westlichen Welt führend in Bezug auf Morbidität und Mortalität. Epidemiologische Studien und randomisierte klinische Versuche haben zu der Überzeugung geführt, dass diese Erkrankung durch multiple genetische und umweltspezifische Faktoren beeinflusst wird.

Durch die Entwicklung der modernen Zell- und Molekularbiologie und die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hofft man, in naher Zukunft einen einschneidenden Wechsel in der medizinischen Diagnostik, der Therapie sowie der Prävention von Krankheiten herbei zu führen.

Durch den molekularen Ansatz gelingt es, Mechanismen und Funktionsweisen von Zellen und die Aufgaben bestimmter Zellbestandteile zu erkennen und die Rolle genetischer Steuerungsmechanismen zu erklären. Durch die Fertigstellung des Human Genom Projekts, des HapMap Projekts, die Entwicklung von Mikroarrays, Proteomik und Nanotechnologie sowie hoch funktionelle sensitive Assays will man die Regeln des Zusammenspiels in Geweben und Organen ergründen. Damit würde es gelingen, gezielt und den Anforderungen des jeweiligen Patienten entsprechend, eine Behandlung einzuleiten und durchzuführen, empirisches Verfahren und symptomatische Therapie würden dann der Vergangenheit angehören oder nur in speziellen Fällen Anwendung finden. Monogenetische Erkrankungen - diese werden durch die Fehlfunktion eines einzelnen Gens verursacht - sind mit dem heutigen Stand der Forschung bereits gut festzustellen, teilweise können sie gezielt behandelt werden. Auf dem Gebiet der CVD, wo das Zusammenspiel von genetischen Komponenten und Umweltfaktoren stark ineinander verquickt ist, beginnt man mit Hilfe der Fortschritte auf dem Gebiet von Nutrigenomiks, den Einfluss der Nahrung auf molekularer Ebene, die metabolischen Stoffwechselvorgänge und die Kontrolle der Homöostase zu klären, die zu dem Formenkreis der CVD führen. Man kann und wird in Zukunft vermehrt die Möglichkeit haben festzustellen, wie bei

nahrungsabhängigen Erkrankungen in der frühen Phase die Regulation gestört ist und in welchem Ausmaß die Sensibilisierung des individuellen Genotyps zu solchen Erkrankungen beitragen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, das derzeitige Wissen auf dem Gebiet der Genetik von CVD und den Einfluss des großen Risikofaktors Ernährung auf molekularer Ebene darzustellen

Die Interaktion von Umgebung und Genen ist eine integrierte Komponente der Evolution. Unsere Nahrungsaufnahme hat sich in den letzten 200 Jahren so dramatisch verändert, dass die Adaption der Gene damit nicht Schritt halten konnte, diese Imbalance resultiert nun in einer Assoziation von Gen Polymorphismen, falscher Ernährung und erhöhtem Risiko für CVD [Ordovas 2006].

Die möglichen Auswirkungen von Makro und Mikronährstoffen auf koronare Herzkrankheit, Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie, Hypertension und vor allem das Endothel der Gefäßwand, welches den Ursprung aller Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises darstellt, werden beleuchtet. Das Gefäßendothel, ein aktives und dynamisches Gewebe, welches für Blutzirkulation, die Fließeigenschaften, die Regulation des vaskulären Tonus, Modulation der Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten sowie Leukozytentransmigration zuständig ist, steht im Mittelpunkt der Betrachtungen. Hier tritt zuerst eine Dysfunktion auf, die sich in weiterer Folge zum Initiator für CVD entwickeln kann.

## **2 GENETIK KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN**

### **2.1 Entwicklung der modernen Molekularbiologie**

Die moderne Molekularbiologie ist mit der Entwicklung der rekombinanten DNA Technologie gleichzusetzen. Miescher isolierte DNA erstmals 1869, 1944 bewies Avery an Hand von Bakterien, dass die DNA und nicht ein Protein für den Transfer der genetischen Informationen zuständig ist, 1953 konnten Watson und Crick die Doppelhelixstruktur der DNA ableiten, was auf den Ergebnissen der Beugung der DNA durch Röntgenstrahlen basierte, die Franklin, Gosling und Wilkins gefunden hatten. Die wissenschaftlichen Forschungsergebnisse von Watson, Crick und Wilkins wurden mit dem Nobelpreis ausgezeichnet, der erste von dreien, der für die Fortschritte auf dem Gebiet der molekularen Genetik vergeben wurde.

Marmor, Lane und Doty zeigten, dass die Denaturation der Doppelhelixstruktur der DNA in einzelne Stränge durch Denaturation mittels hoher Temperaturen vollzogen werden kann und die Stränge bei Rückkehr zu niedrigeren Temperaturen wieder vereint werden. Diese Eigenschaft der DNA ermöglicht viele Vorgänge, unter anderem auch die DNA Amplifikation bei der Polymerase Ketten Reaktion (PCR).

1961 und 1965 wurde von Nirenberg, Matthaei und Nishimura experimentell gezeigt, dass Aminosäuren in der Proteinsynthese über Basentriplets kodiert werden. Das Experiment markierte das Ende eines weltweiten Rennens um das Begreifen des genetischen Codes, die Wissenschaftler wurden mit dem Nobelpreis auf dem Gebiet der modernen Genetik ausgezeichnet. Die darauffolgende Entzifferung des Codes eröffnete den wichtigsten experimentellen Zugang zur Genetik, Nirenberg erhielt 1968 zusammen mit zwei anderen Wissenschaftlern den Nobelpreis für diese Entdeckung.

Olivera et al. entdeckten das Enzym DNA Ligase, womit sie einen Beitrag zur rekombinanten DNA Technologie leisteten. Die Möglichkeit, DNA zu isolieren, manipulieren und zu klonen wurde erst durch sechs weitere wissenschaftliche Entdeckungen möglich:

- 1) Entdeckung der Restriktionendonuklease
- 2) Entdeckung der reversen Transkriptase
- 3) Klonen der DNA
- 4) Fähigkeit des Sequenzierens von Basen eines DNA Fragments
- 5) Möglichkeit der Änderung spezifischer Aminosäure Codes, um Struktur und Funktion von Proteinen zu studieren
- 6) Den Beginn der Polymerase Ketten Reaktion, womit die Vervielfältigung von ausgewählten DNA Sequenzen exponentiell bewirkt werden kann [Robert Roberts 2006].

Ad 1) Restriktionsendonukleasen kommen nur in Bakterien vor, sie haben die Eigenschaft, die DNA an bestimmten Stellen zu trennen. Bakterien schützen sich dadurch vor fremder DNA. Sie sind für die Gentechnologie interessant, weil sie zwischen einer Sequenz von 4 bis 8 Nukleotiden spezifisch schneiden.

Ad 2) die reverse Transkriptase wurde bei Retroviren entdeckt. Diese RNA – abhängige DNA Polymerase kann als Matrize sowohl RNA- als auch DNA-Einzelstränge verwenden und stellt somit eine complementary DNA (cDNA) her. Somit kann man die cDNA mit dem komplementären DNA Strang binden. Damit wurde das ehemalige Dogma, das lange Zeit galt, DNA zu RNA kann nicht umgekehrt werden, widerlegt. Vor allem für den Fortschritt des Klonens war dies wichtig, da nur das Gen in der DNA Form repliziert werden kann. Der Anteil der DNA, der für ein Protein kodiert, ist etwa 1,5 %<sup>1</sup> aller DNA. Mit der Möglichkeit RNA in DNA Sequenzen zu konvertieren, konnte man die Gene entdecken. Die cDNA enthält keine Introns, somit ist die Lage am Chromosom

---

<sup>1</sup> Die Human Genom Projekt Informationsseite spricht von 2%

leicht zu erkennen, außerdem hat sie eine stabilere Nukleinsäurestruktur als die RNA [Robert Roberts 2006, Löffler 2007].

Ad 3) Klonen ist eine Methode, bei der man viele Kopien eines DNA Fragments, welches ein Gen beinhaltet, gewinnen kann. 1972 wurde das erste rekombinante DNA Molekül an der Stanford Universität erzeugt und 1973 wurde das erste fremde DNA Fragment in ein Plasmid inseriert. Plasmide können nach Lyse der Bakterien durch Zentrifikation vom bakteriellen Chromosom abgetrennt und relativ rein isoliert werden. So gewonnene Plasmide werden von anderen Bakterien aufgenommen, wenn diese durch entsprechende Vorbehandlung kompetent gemacht werden. Nach der Isolierung baut man dieses Plasmid in eine fremde DNA ein, das Bakterium lässt man in einem geeigneten Nährboden wachsen und das Plasmid<sup>2</sup> repliziert sich. Man kann mRNA, die für ein spezifisches Protein kodieren, mit Hilfe der reversen Transkriptase in eine stabile cDNA konvertieren, welche mit einem Plasmidvektor rekombiniert wird, dies in ein Bakterium einpflanzen, in einem Kulturmedium zum Wachsen bringen und somit große Mengen einer spezifischen DNA Sequenz oder eines Genes produzieren.

Ad 4) Der Beitrag bestand darin, dass eine DNA Sequenzierungsmethode von Sanger in Cambridge und zur gleichen Zeit von Gilbert in Harvard entwickelt wurde. Man konnte damit eine DNA unbekannter Sequenz in Teile zerlegen, mittels Plasmidvektoren klonen, große Mengen davon erzeugen und die spezifische DNA Sequenz bestimmen.

Ad 5) 1982 beschrieben Smith et al. die Technik der gerichteten Mutagenese. Smith et al. gelangen bahnbrechende Arbeiten zur Oligonukleotidsynthese. Sie entwickelten die bis heute unübertroffene Trityl-Schutzgruppe für das 5-OH. Smith konnte zeigen, dass Oligonukleotide auch dann stabile Basenpaare eingehen, wenn wenige Fehlpaarungen vorkommen, dies ist heute eine der

---

<sup>2</sup> Plasmide sind kleine ringförmige DNAs, die in Bakterienzellen vorkommen, sie replizieren sich selbst unabhängig vom bakteriellen Chromosom. In Bakterien tragen derartige Plasmide die Gene für die Konjugation von Bakterienzellen oder Antibiotikaresistenzen

wichtigsten Methoden in der Biotechnologie. Dabei wird mit Hilfe der rekombinanten RNA eine gezielte Veränderung der DNA ermöglicht. Es können bestimmte Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht oder auch ganze Gene entfernt werden. Dieses Verfahren ist eine inzwischen weit verbreitete Methode in der Molekularbiologie, welche von der Veränderung eines Gens auf einem Plasmid bis hin zur Knockout-Maus reicht. Man kann die verschiedenen Regionen eines Gens für ein Protein studieren, Regionen oder Domänen feststellen, die für eine bestimmte Funktion wichtig sind, man nennt das die Struktur-Funktionsanalyse. DNA-Mutationen, die zu Erkrankungen führen, können festgestellt werden, da man den physiologischen Effekt einer Mutation bestimmen kann. Sie führte zur Entdeckung von Stoffwechselwegen humaner Dysfunktionen

Ad 6) die Entwicklung der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ermöglicht, ausgewählte DNA oder RNA Fragmente in extrem hohem Ausmaß zu amplifizieren. Diese Reaktion ist das letzte Instrument für die moderne Molekularbiologie. Diese Entdeckung wurde 1985 von Kary Mullis neu aufgegriffen (etwa 10 Jahre zuvor hatte der Norweger Kjell Kleppe die Idee, DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen, dies geriet allerdings in Vergessenheit). Mullis wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Die PCR hat die Fortschritte auf dem Gebiet der Entdeckung der Genetik menschlicher Erkrankungen entscheidend weiter getrieben. Die Technik der PCR wurde zuerst für die Erforschung pathogener Mechanismen, die genetisch festgelegt sind und Erkrankungen zugrunde liegen, verwendet [Robert Roberts 2006, Löffler 2007, Alberts 2005]

Für die pränatale Diagnostik der Sichelzellanämie wurden schon 1985 zwei sensible Testmethoden eingesetzt. Durch Primer vermittelte enzymatische Amplifikation von vorgegebenen Beta-Globin Sequenzen der genomischen DNA konnte man 220,000 Kopien dieser DNA erzeugen. Bei der zweiten Technik wurde das Vorhandensein des Beta A und Beta S Alleles mittels Restriktionsendonuklease-Verdau einer markierten Oligonukleotid Probe, die zu

den amplifizierten Beta-Globin Sequenzen dazu gegeben wurde, bestimmt. So konnte der Beta-Globin Genotyp in weniger als einem Tag festgestellt werden und das aus Spuren von genomischer DNA [Saiki RK 1985].

## **2.2 Single Nukleotid Polymorphismus (SNP)**

SNP sind Variationen der DNA Sequenz, eine lineare Kombination von vier Nukleotiden. Vergleicht man zwei Sequenzen von Position zu Position und findet man ein unterschiedliches Nukleotid an der gleichen Position, so ist das ein SNP. Sie geben großen Aufschluss über die Entwicklungsgeschichte des Menschen.

Die erste Studie dieser Art wurde gegen Ende des Ersten Weltkrieges von Ludwik und Hanka Hirszfeld über die Frequenz des ABO System der Blutgruppen gemacht. Trotz der enormen Größe dieser Studie - es wurden viele ethnische Gruppen der Weltbevölkerung abgedeckt und gewissenhaft Details aus anthropologischen Studien verwertet – wurde sie in Unkenntnis der Tragweite dieser Entdeckung als grundlegende Studie humaner genetischer Variationen nicht in Lancet sondern in einem zweitrangigen Journal veröffentlicht. So blieb die Entdeckung, dass Anthropologie und die Verteilung von Agglutininen zusammen hängen, Felix Bernstein überlassen.

Dieser verwendete die Daten Hirszfelds und zeigte, dass die ABO Blutgruppenverteilung durch ein einzelnes Gen mit drei Varianten (Allelen) erklärt werden kann [Stoneking 2001].

SNPs zeigen frühere Mutationen an, welche größtenteils einmalige Ereignisse waren, zwei Individuen, die ein abweichendes Allel teilen, sind somit durch das allgemeine evolutionsbedingte Erbe gekennzeichnet.

Die meisten Variationen unter den Menschen, die genetisch bedingt sind, können durch SNPs aufgedeckt werden, wichtig sind vor allem jene, die anzeigen, dass man für gewisse Erkrankungen prädisponiert ist [Stoneking 2001].

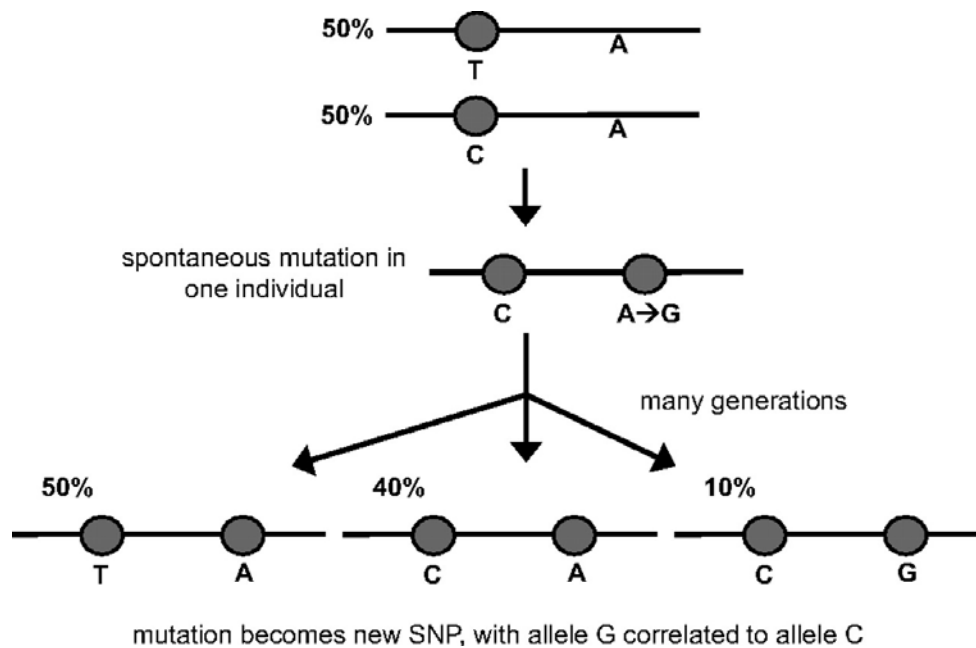
### **2.3 Linkage Disequilibrium: Die Korrelation unter SNPs**

Gruppen von SNPs stehen in gegenseitiger Beziehung zueinander, dieses Phänomen wird Linkage Disequilibrium genannt. Während der Meiose kommt es zur Rekombination an verschiedenen Stellen zwischen jedem Paar von Chromosomen, damit wird den Nachkommen eine genetische Variabilität mitgegeben.

Dies ist kein wahlloses Geschehen, welches an jedem Platz des Chromosoms geschehen kann. Es gibt lange Strecken am Chromosom, wo eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, dass eine Rekombination entsteht, mit der Ausnahme von Hotspots, wo es relativ häufig geschieht. Daraus resultiert, dass Strecken des Chromosoms zwischen zwei Hotspots zusammen weiter gegeben werden, diese Abschnitte nennt man Haplotypen, sie werden von Generation zu Generation weiter gegeben [Musunuru 2008].



### Die Genese eines neuen SNP korrelierend mit einem alten SNP



**Abbildung 1:** Die Genese eines neuen SNP

Anfangs gibt es nur 1 SNP (T/C) in der abgebildeten Region. Eine spontane Mutation in einem einzelnen Individuum verändert ein A Nukleotid zu einem G Nukleotid. Nach vielen Generationen ist ein neuer A/G Polymorphismus entstanden. Dieses G Allel haben 10% der Population. Da keine Rekombination zwischen den zwei SNPs aufgetreten ist, haben alle Chromosomen mit dem G Allel ein C Allel beim anderen SNP. [Munsuru K. et al.; Circ Cardiovasc Genet 2008;1:66-71]

## 2.4 Das HapMap - Projekt

HapMap ist die Abkürzung für Haplotype Map, dieses Projekt katalogisiert allgemeine genetische Variationen, die in der menschlichen Spezies auftreten. Das internationale HapMap - Projekt wurde 2002 ins Leben gerufen. Es wurden 269 DNA Proben von Menschen aus vier verschiedenen ethnischen Gruppen genommen, deren Herkunft Nord-West Europa (Bewohner von Utah), Nigeria, Japan und China waren. Es sind nun von allen diesen Populationen 3 Millionen SNPs genotypisiert worden und stehen öffentlich zur Verfügung. Die Analyse

dieser Daten hat interessante Aufschlüsse gebracht: wenn auch die vier Gruppen die meisten SNPs teilen, so variiert die Allelfrequenz an diesen SNPs stark. Rekombinierte Hotspots sind weit über das Genom verstreut, die allgemeinen sitzen eher an den Telomeren der Chromosomen und die selteneren sitzen näher am Centromer. SNPs in der Nähe von rekombinierten Hotspots haben eine geringere Korrelation mit umgebenden SNPs verglichen mit jenen, die in einiger Entfernung vom Hotspot vorkommen.

Diese Daten können für das Studium der Veränderung von genetischen Faktoren auf Umwelteinflüsse herangezogen werden, es werden wichtige Hinweise für den Verlauf von Infektionen abgeleitet und die Wirkung von Arzneimitteln und Vakzinen wird durch die Daten des HapMap Projekts besser verstanden.

Die DNA Sequenz unter den Menschen ist zu 99,9% identisch. Die Variationen können allerdings die Anfälligkeit des Einzelnen für Erkrankungen stark beeinflussen. Dort, wo es eine Reihe nah beieinander gelegener SNPs auf demselben Chromosom gibt, also einen Block, der so vererbt wird, spricht man von Haplotyp. Dieser kann viele SNPs beinhalten. Da ein gegebener SNP im Linkage Disequilibrium (LD) mit einem anderen SNP in der gleichen Region stehen kann, ist es möglich, mit dem Wissen um den Genotyp des ersten SNP's auf den Genotyp des anderen Rückschlüsse zu ziehen, der erste SNP identifiziert (tagging) den anderen. Auf diese Art kann ein SNP dazu dienen, eine Anzahl anderer SNPs zu taggen, man nennt diese SNPs auch Tag SNPs. So wurden an Stelle von 10 Millionen existierenden SNPs das menschliche Genom mit etwa 500.000 Tag SNPs identifiziert.

Die meisten Studien basieren auf der Annahme, dass eine höhere Frequenz von genetischen Komponenten, die zu einer Erkrankung beitragen, in jener Population zu finden ist, die an dieser erkrankt ist, als jener, die gesund ist und unter ähnlichen Bedingungen lebt. Die Wissenschaftler untersuchen nun die Chromosomen Regionen, welche verschiedene Haplotypregionen aufweisen. Diese Regionen werden dann genau unter die Lupe genommen, um zu sehen,

welche Varianten zu der Erkrankung führen können [Musunuru 2008, [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org) (02.12.2009)].

## **2.5 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Genetik**

Die Pathogenese der CVD zeigt eine intensive Verflechtung von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Der Beitrag, den die einzelnen Komponenten zur Entwicklung der Erkrankung und dem Aufscheinen diverser Symptome beitragen, differiert sowohl bei der Ausprägung des Krankheitsbildes als unter den Patienten. Eine ernste phänotypische Ausprägung kann als Resultat einer Mutation in einzelnen Genen auftreten, dazu gehören etwa die monogenetischen Formen der Hypertonie, die Mehrzahl der CVDs ist aber auf Mutationen in vielen Genen zurückzuführen [Delles 2008].

Man hat sich zum Ziel gesetzt, diese Gene zu identifizieren, die die Ausprägung des Phänotyps für kardiovaskuläre Risikofaktoren bewirken. Durch das Testen von Kandidatengenen und die Verwendung von anonymen hoch polymorphen Markern durch Linkage Studien in genomweiten Untersuchungen konnte man feststellen, wo gewisse Gene mit den vermuteten Merkmalen liegen, es blieb aber die Frage offen, welche Gene nun exakt zum Tragen kommen, welches die relevanten Variationen der Gene sind und wie sie funktionieren, um das Risiko für eine Krankheit in sich zu tragen.

Durch die Einführung von hochdichten Arrays, in welchen bis zu einer Million SNPs in tausenden von Proben festgestellt werden können, wurde die Möglichkeit zur Beantwortung dieser Fragen geboten. Durch die Fein-Kartierung konnte eine genauere Information gegeben werden, weil es auf dem LD beruht und dieses über kürzere Strecken am Chromosom genauere Aussagen gibt als Linkage (Verbindung zwischen Genen) alleine [Borecki 2009].

Es ist vor allem für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der CVD wichtig, die genetische Basis der Atherosklerose zu identifizieren und im Anschluss daran neue diagnostische und therapeutische Konsequenzen zu ziehen.

## 2.6 Genomweite Assoziationsstudien (GWA)

Die Einführung von GWA Studien ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung, sie führten zur Identifizierung von prädisponierten Allelen in vielen komplexen Erkrankungen. Sie stehen als Gegenpol zu Linkage Studien, welche wenig zur Erforschung von Genen für komplexe Erkrankungen beitragen konnten oder Studien, die auf quantitative Trait-Loci (QTL) und auf Kandidatengen basierten, die nicht nachvollziehbar waren. QTL sind Abschnitte eines Chromosoms, wo in Studien festgestellt worden ist, dass sie Einfluss auf die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals haben, QTL Analyse erlaubt Wissenschaftler aus vielen Gebieten komplexe Phänotypen mit einer spezifischen Region des Chromosoms zu verbinden. Das Ziel dieses Prozesses ist, die Aktionen, Interaktionen und die präzise Lokalisation dieser Region festzustellen. [Miles, C. & Wayne, M. (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. Nature Education 1, (15.03.2010)].

Wie QTL Mapping vor sich geht, kann man am besten an Labortieren erklären: zwei durch Inzucht erzeugte Mäusestämme, welche ausgewählt worden waren, da sie sich in der messbaren oder durch Beobachtung festgestellten Ausprägung des Phänotyps unterscheiden, pflanzen sich zusammen fort und dadurch entsteht die F1 Generation. F1 Mäuse werden mit einer Elternform zurückgekreuzt und es entsteht die F2 Generation. Diese differiert in der Empfänglichkeit für Erkrankungen, da es zu einer Neuordnung der Chromosomen während der Meiose kommt. Nun wird die Inzidenz der Erkrankung oder der Schweregrad des Subphänotyps der Erkrankung in F2 Mäusen gemessen und die chromosomalen Regionen werden mit jedem Stamm der ursprünglichen Elterngeneration statistisch verglichen. Hat ein gegebenes Paar von Inzuchtmäusen z.B. 10-15 Regionen, die zum komplexen Phänotyp in diesem Stamm beitragen, so können nun verschiedene Paarungen von Stämmen neue QTL's aufzeigen [Kaput 2004].

GWA Studien wurden durch folgende Errungenschaften möglich:

- die Kompletierung des menschlichen Genoms, die Entdeckung von Millionen von SNPs
- das internationale HapMap Projekt, das die Muster des LD im humanen Genom charakterisiert,
- den technischen Fortschritt durch die Hochdurchsatz Genotypisierung
- die fortwährende Entwicklung der Bioinformatik

Im Gegensatz zu Kandidatengenomen, wo Gene, die mit einiger Sicherheit zu einer Erkrankung beitragen, untersucht werden, ermöglichen GWA Studien einen relativ umfassenden Scan des Genoms in einer agnostischen Form, die es ermöglicht, neue Gene oder QTL zu finden, die zu Erkrankungen prädisponieren.

Das Design der GWA Studien basiert auf der Annahme, dass gewöhnliche Variationen mit einem mäßigen Effekt auf allgemeine Merkmale existieren und das wesentliche Ausmaß des Merkmals erklären. Der Vorteil gegenüber Linkage und QTL Studien liegt darin, dass die GWA Signale Regionen von 10-100kb wahrnehmen, wodurch das Fine Mapping für aktuelle Erkrankungen und mögliche QTL mit geringerem Aufwand möglich ist, außerdem können Allele identifiziert werden, die eine geringe effektive Größe haben.

Durch GWA Studien hat man in kurzer Zeit genetische Variationen gefunden, die sich auf CVD beziehen, wie etwa BMI, Blutfettwerte und Entzündungsparameter; es wurden etwa 35 Loci entdeckt, die atherosklerotische Veränderungen bewirken oder zu solchen führen. Besonders wertvoll war das Erkennen von vorher unbekannten pathologischen Stoffwechselwegen, die atherosklerotischen Veränderungen unterliegen.

## **2.6.1 Überlegungen zu den Methoden von GWA**

### **2.6.1.1 Phänotypen von CVD**

Für Fall-Kontroll Studien sollten die Teilnehmer in solche, die die phänotypische Ausprägung haben und solche, die frei davon sind, geteilt werden können. Die ausgewählten Teilnehmer sollten an folgende Variable angepasst sein:

- Soziodemographische Variable (Zugehörigkeit zu einer Rasse, dieselbe geographische Region)
- Bei CVD sollte man verschiedene Phänotypen studieren wie:
- koronare Herzkrankheit (KHK),
- Myokardinfarkt (MI),
- periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) und den
- aneurysmatischen Formenkreis,

weil sie die Ursachen für die jeweilige Ausprägung verschiedener Genese sind.

Weiters ist es problematisch, eine passende Vergleichskontrolle zu finden, da die Anlagen für CVD oft subklinisch vorhanden sind, die phänotypischen Merkmale eben noch nicht sichtbar. Als mögliche Lösung würde sich hier anbieten, die Studien an älteren Teilnehmern durchzuführen, da hier die Wahrscheinlichkeit steigt, dass der Phänotyp die Merkmale einer CVD ausgeprägt hat. Eine genaue Standardisierung ist besonders bei Studien wichtig, die in verschiedenen Zentren stattfinden und wenn Metaanalysen geplant sind.

### **2.6.1.2 Genotypisierende Plattformen**

Bei den derzeitigen GWA Studien bestehen die Assays, die das Genom untersuchen, aus einem dichten Set von Markern. SNPs können so gewählt werden, dass das Genom gleichmäßig gescannt wird oder gewöhnliche Variationen im Genom, wie sie von der HapMap Datenbasis definiert sind,

anzeigen. Affymetrix Inc. und Illumina Inc. sind bekannte Datenbasen, die andere SNPs Selektionen für Genotypisierung anbieten. Man muss darauf achten, dass die Datenbasen für den jeweiligen Zweck der Untersuchung und auch der ethnische Rasse entsprechend passend sind.

### **2.6.1.3 Qualitätskontrolle der Genotypisierung**

Fehler, die bei der Genotypisierung auftreten, können falsche Assoziationen bewirken und ebenso die Aussagekraft der Statistik schwächen, daher muss man die Daten vorher prüfen. Im Speziellen führen unterschiedliche Fehlerraten bei der Genotypisierung von Fällen und Kontrollen zu einer Vergrößerung des Typ 1 Errors<sup>3</sup>.

Üblicherweise sollten die Daten folgenden Kriterien entsprechen:

- die Minimalrate von erfolgreich typisierten SNPs/Proben
- das Größenverhältnis der Proben, für welche ein SNP gemessen werden kann (SNP call rate)
- die Konkordanz in duplikaten Proben sollte 99% betragen
- keine starke Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium<sup>4</sup>
- keine Fehler in den nuklearen Familien, die auf der Mendelschen Vererbung beruhen.
- Die statistische Analyse muss der Studie entsprechen, eine Korrektur für multiple Tests und für die Schichtung der Populationen müssen gemacht werden.

---

<sup>3</sup> Fehler, der auf der falschen Ablehnung der Nullhypothese in einer statistischen Untersuchung beruht

<sup>4</sup> Konstruktion einer idealen Population, wo sich weder die Häufigkeit der Allele noch die Häufigkeit der Genotypen verändert.

#### 2.6.1.4 Imputation

Es gibt Methoden, welche SNPs zuteilen, die nicht tatsächlich gemessen worden sind. Sie verwenden Varianten im LD, um auf fehlende Genotypen in nicht typisierten Varianten rückzuschließen. Dadurch kann man die Power in GWA Studien mäßig erhöhen. Außerdem kann man mit dieser Methode leichter Daten vereinen, die mit verschiedenen Datenbasen typisiert worden sind. Durch Imputation kann man Assoziationstests ausführen, die eine genauere Auflösung des Genoms geben. Sollte man eine signifikante Assoziation für einen nicht gemessenen SNP finden, dann sollte man die Bestätigung durch Genotypisierung suchen.

#### 2.6.1.5 Studiendesign und statistische Power

Bei komplexen Erkrankungen haben die Varianten, die störanfällig sind, eine bescheidene effektive Größe mit einer Odds Ratio (OR)<sup>5</sup> von 1.1 bis 1.5

Die statistische Power, um Assoziationen zwischen genetischen Variationen und einer Funktion des Phänotyps zu entdecken, ist eine Funktion von verschiedenen Faktoren, welche die Frequenz des Risiko Allels, des Genotyps, der Korrelation zwischen dem genotypisierenden Marker und dem „wahren“ Risiko Allel, der Probengröße und die genetischen Heterogenität der Studienpopulation beinhalten.

Die statistische Power wird erhöht, wenn die Frequenz der Risikoallele (RAF) höher ist. Das Risikoallel hat einen ziemlich starken Effekt, ebenso wird eine hohe Probenanzahl benötigt. Man braucht etwa 1000 Fälle und 1000 Kontrollen um eine  $OR > 1.5$  und einer Power von 80% zu erreichen, Viel größere Proben

---

<sup>5</sup> „Die Odds ratio (Chancenverhältnis) gibt an, wie hoch die Chance ist, dass ein Merkmal (von zwei Alternativmerkmalen) für eine Gruppe (von zwei Gruppen) vorliegt. Dazu werden die Häufigkeiten, d. h. die Anzahl der Individuen in einer Vierfeldertafel angegeben.“  
[<http://www.criticalcare.at/Statistik/Odds%20ratio.htm>, (14.03.2010)]



sind erforderlich, um ein Risiko Allel mit einer OR  $<1.5$  zu bekommen und Gen-Gen oder Gen-Umwelteinflüsse zu erkennen.

Stichhaltige statistische Schwellenwerte reduzieren falsch positive Resultate, man kann dadurch auch wahre Assoziationen übersehen. Falsch negative Resultate können aus Mangel an genetischen Variationen der genotypisierenden Datenbasis entstehen, es kann auch an der genetischen Heterogenität zwischen den Fällen und den Kontrollen liegen oder am Mangel an SNPs bei der Population, die untersucht wird.

Verschiedene Varianten, die mit CVD assoziiert worden sind und welche in Studien mit Kandidatengen festgestellt worden waren, konnten mit GWA Studien nicht bestätigt werden, dazu gehört etwa der C677T SNP in der 5,10-Methylenetetrahydrofolat Reduktase Gen und der Q192R SNP im Paraoxonase 1 (PON1) Gen.

#### **2.6.1.6 Replikation**

Eine Replikationsstudie dient zum Prüfen der Resultate früherer Studien. Bei einer GWA Studie ist die Replikation von Resultaten in unabhängigen Proben als kritisch zu betrachten, da man aus vielen falsch positiven Resultaten jene herausuchen möchte, die wahr sind.

Folgende Kriterien zur Prüfung werden empfohlen:

- Dieselbe oder eine ähnliche Populationskohorte oder Phänotyp
- Eine adequate Größe der Proben
- Dasselbe genetische Modell
- Eine ähnliche Effektgröße und statistische Signifikanz für den gleichen SNP, oder einen SNP in engem LD zum original SNP

### **2.6.1.7 Fine Mapping und funktionelle Assays**

Immer dann, wenn ein Signal entdeckt wird, braucht man ein Fine Mapping und biochemische Assays, um die zu Grunde liegende Variante und ihren kausalen Effekt zu bestätigen. Man braucht sowohl bioinformatische und experimentelle Hilfsmittel, um die gewonnene Information zu maximieren [Ding 2009].

## **2.7 Die koronare Herzkrankheit (KHK)**

Wie schon erwähnt, versucht man für CVD genetische Faktoren zu finden, die zusammen mit dem Lebensstil zum Phänotyp der CVD führen. Im Juni 2007 wurde in der Zeitschrift "Nature" die gemeinsame GWA des Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) veröffentlicht. Es wurden 2.000 Personen auf allgemeine Erkrankungen in der englischen Bevölkerung und 3.000 Kontrollen untersucht. Mittels einer Fall-Kontrollstudie konnte man ein Assoziationssignal für KHK identifizieren. Es wurde auf Chromosom 9p21.3 gefunden. Das stärkste Signal war bei rs1333049, Assoziationen wurden über einen Bereich von 100kb festgestellt. Diese Region beinhaltet die Gene für zwei Inhibitoren der Cyclin abhängigen Kinase, CDKN2A und CDKN2B, beide Gene haben mehrere Isoformen und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Sie werden in Makrophagen exprimiert, aber nicht in den glatten Muskelzellen der fibrös-fetthaltigen Läsionen der atheromatösen Plaques. Die Expression von CDKN2B wird durch die Transformation des Transforming Growth Factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) bewirkt und dieses Signalsystem ist in die Pathogenese der Atherosklerose verwickelt [WTCCC 2007].

Dieser Polymorphismus auf Chromosom 9p21.3 konnte auch in einem Kollektiv der ostasiatischen Bevölkerung nachgewiesen werden [Hinohara 2008].

Bei einer GWA Studie, die an der Bevölkerung von Island durchgeführt worden war, (4587 Fälle und 12.767 Kontrollen) konnten auf Chromosom 9p21.3 drei korrelierende SNPs gefunden werden. Es wurde eine Replikationsstudie an 665

Patienten mit MI und 3.533 Kontrollen durchgeführt und ebenso drei Fall-Kontrollstudien, deren Teilnehmer europäischer Abstammung waren. Es stellte sich heraus, dass SNP rs10757278 die engste Korrelation mit der Erkrankung hatte.

Study population (n/m) Variant (allele)	Genotype-specific OR			PAR
	00	0X (95% CI)	XX (95% CI)	
Iceland (2272/10,261)				
rs10757278 (G)	1	1.25 (1.12–1.39)	1.58 (1.38–1.81)	0.19
U.S. groups (2315/2506)				
rs10757278 (G)	1	1.28 (1.14–1.45)	1.72 (1.45–2.03)	0.23
All groups (4587/12,767)				
rs10757278 (G)	1	1.26 (1.16–1.36)	1.64 (1.47–1.82)	0.21
<i>Early-onset MI (&lt;50 for males; &lt;60 for females)</i>				
Iceland (621/10,261)				
rs10757278 (G)	1	1.38 (1.13–1.69)	1.94 (1.53–2.46)	0.27
U.S. groups (1080/2506)				
rs10757278 (G)	1	1.56 (1.32–1.85)	2.08 (1.69–2.58)	0.34
All groups (1701/12,767)				
rs10757278 (G)	1	1.49 (1.31–1.69)	2.02 (1.72–2.36)	0.31

**Tabelle 1:** Genotypen spezifische Odds Ratio

(OR) für das Risiko Allel von rs10757278. Risiko für heterozygote- (OX), homozygote Carrier (XX) ist mit dem Risiko für Non Carrier verglichen, zusammen mit 95% Konfidenzintervall und dem der Population zuschreibbaren Risiko (PAR). Der untere Teil der Tabelle inkludiert die korrespondierenden Werte, wenn die Analyse auf jene Fälle mit frühem MI reduziert wird. Die Studienpopulation inkludiert die Zahl (n) der MI Fälle und Kontrollen (m). Für die Islandgruppe wurden die Werte für die Beziehung zur Simulation angepasst.

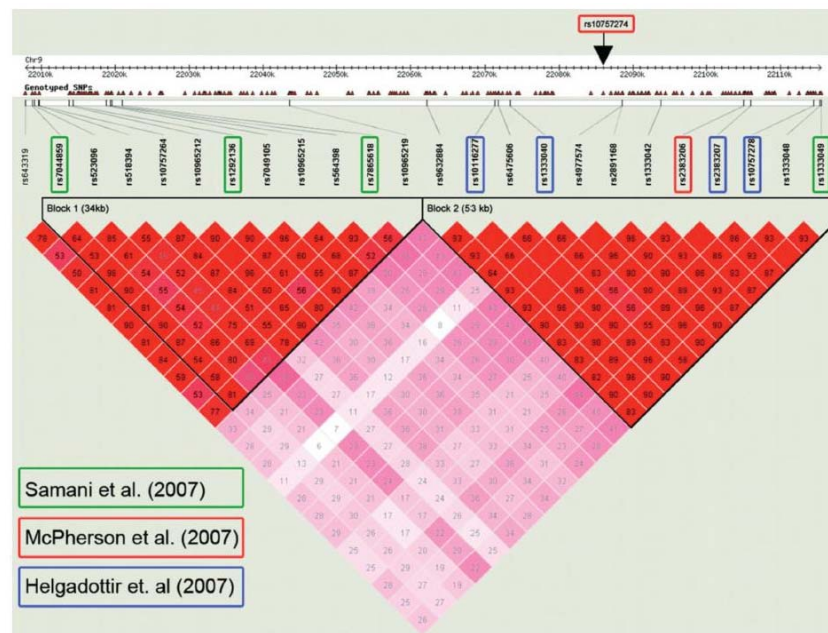
Die Varianten am Chromosom 9p21 sind im LD Block, der CDKN2A und CDKN2B enthält, lokalisiert. Es konnte aber kein Kandidatenmerkmal für funktionelle Varianten oder andere Varianten, die die Assoziation mit rs 10767278 erklären könnten, gefunden werden. Es wäre denkbar, müsste aber noch untersucht werden, dass dieser SNP einem hypothetischen Methylthioadenosin-Phosphorylase-Fusionsprotein des mRNA Transkript AF109294 und verschiedenen darauffolgenden Tags, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, zugehörig ist [Helgadottir 2007].

Eine weitere Untersuchung, die auch im Jahre 2007 veröffentlicht wurde, arbeitete mit einem GWA Scanning, um das 58 kb Intervall auf Chromosom 9p21 zu identifizieren, welches in sechs anderen Studien mit mehr als 23.000 Teilnehmern kaukasischer Abstammung mit KHK in Verbindung gebracht worden war. Das Intervall, welches nahe CDKN2A und CDKN2B liegt, enthält kein bereits beschriebenes Gen und wurde auch nicht mit bereits etablierten Risikofaktoren wie Plasma-Lipoproteine, Hypertension oder Diabetes in Verbindung gebracht. Um die falsch positive Assoziation zu vermeiden, wurden drei sequentielle Fall-Kontrollstudien mit einer nominalen Signifikanzschwelle von  $p < 0.025$  durchgeführt. Es wurden zwei SNPs identifiziert, rs10757274 und rs2383206, die mit KHK identifiziert werden konnten.

Um dies zu validieren, wurden drei zusätzliche Kohorten geprüft und auch hier konnte die Verbindung zur KHK festgestellt werden.

Mit anschließenden Fine Mapping Studien, wurde gezeigt, dass rs10757274 und rs2383206 einen Haplotyp von 58 kb umfasst. Bei homozygoten Trägern, das sind etwa 20-25% der kaukasischen Bevölkerung, besteht ein 30-40% höheres Risiko an KHK zu erkranken [Pherson 2007].

Schon 2002 fand Yamada am Chromosom 1p35.1 in einer japanischen Population, dass das Risiko für MI signifikant mit dem 1019C-T Polymorphismus im CX37 Gen (ser319-to-pro;  $P < 0.001$ ) bei Männern und dem -668 4G/5G Polymorphismus im PAI1 Gen (173360.0002) und dem -1171 5A/6A Polymorphismus im MMP3 Gen (185250.0001) bei Frauen zusammenhängt. Der Autor schloss daraus, dass durch die Bestimmung des Connexin 37, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1 und des Stromelysin-1 Gens das Risiko, einen MI zu bekommen, genetisch vorhersagbar wäre und für die präventive Diagnostik verwendbar sei [Yamada 2002].



**Abbildung 2:** Korrelationsstruktur am 9p21 Locus

Diese ist mit MI assoziiert. Es werden die LD Relationen dargestellt (definiert als  $r^2$  metrisch) zwischen SNPs Paaren. Jedes Quadrat repräsentiert die paarweise Stärke und die Signifikanz der Korrelation, rot zeigt hohe Korrelation (hoher  $r^2$  Wert) und weiß zeigt schwache Korrelation (niederer  $r^2$  Wert). Die Index SNPs mit der höchsten Korrelation aus drei GWA Studien (oben erwähnt), jede der Studien verwendete eine andere genotypisierende Plattform, sind mit bunter Umrahmung unten links angeführt. Die anderen SNPs sind von der HapMap Datenbasis. (Musunuru et al. 2008)

Auf Grund der Größe der Studie und der verwendeten Zwei-Stufen Analyse sind auch andere Autoren der Meinung, dass die Resultate dieser Studie bemerkenswert und nicht durch Zufall zustande gekommen sind.

Das C Allel von C1019T Polymorphismus im Connexin 37 Gen konnte mit Atherosklerose bei einer Studie an einer Population taiwanesischer Abstammung in Verbindung gebracht werden und auch bei einer Studie an schwedischen Männern, wohingegen bei Yamada das T Allel als Risikofaktor für MI bei japanischen Männern in Zusammenhang gebracht worden war [Peters und Boeckholdt 2002].

Unlängst wurde eine GWA, die MI zum Thema hatte, an 1.222 deutschen Individuen und 1.298 Kontrollen durchgeführt. Es war eine Studie, die bezüglich der SNP Daten in drei Abschnitte gegliedert worden war. Weiters wurden Replikationsstudien mittels *in silico* screening<sup>6</sup> an drei weiteren genomweiten Datensets (insgesamt 25.000) vorgenommen. Es wurde ein neuer Risiko Locus identifiziert (3q22.3. in *MRAS*<sup>7</sup>), der eine sehr gute Signifikanz aufzeigte ( $P = 7.44 \times 10^{-13}$ ; OR = 1.15, 95% CI = 1.11–1.19). Es bleibt nun noch zu prüfen, in welcher Weise dieser Locus zur CVD beiträgt [Erdmann 2009].

## 2.8 Copy Number Variation (CNV)

Trotz der Erkenntnis, dass durch chromosomale Abnormalitäten gewisse Effekte entstehen, ist viel an strukturellen Variationen im Genom bis vor Kurzem unerkannt geblieben. Deletionen und Duplikationen von DNA Strängen in Größen von einigen hundert bis mehreren Millionen von kb, die man kollektiv CNV nennt, sind weit verbreitet. Die seit 2007 durchgeführten GWAs stützen ihre Untersuchungen auf SNPs. Verschiedene Autoren meinen, durch CNV Untersuchungen bei komplexen Erkrankungen noch detailliertere Untersuchungsergebnisse für den genetischen Hintergrund zu finden.

### 2.8.1 Definition

Für fast alle Gene im menschlichen Genom, erbt man eine Kopie von jedem Elternteil, so haben wir zwei Kopien im Nukleus von diploiden Zellen. Die einfachste Form einer CNV ist die An- oder Abwesenheit eines Gens. So wird bei den Europäern das Weitergeben des Rhesus negativen Blutgruppenmerkmals

---

<sup>6</sup> Bei diesem Screening wird eine Vorauswahl der zu testenden Substanzen getroffen, man kann damit durch Reduktion der experimentellen Versuche Zeit sparen [Fülbeck 2007].

<sup>7</sup> Mitglieder der RAS Superfamilie der GTP Bindungs Proteinen, welche *MRAS* inkludieren, sind in der Membran verankert, sie übertragen intrazelluläre Signale und sind für eine Vielzahl von normalen Zellfunktionen verantwortlich [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=608435> (11.12.2009)].

durch die Deletion des Rhesusfaktor D (RHD) Gens verursacht. Das diploide Genom des Einzelnen kann zwei, eines oder null Kopien des RHD haben.

Im Allgemeinen können Segmente des Genoms mit einer variablen CNV Teile des Gens umfassen, völlig außerhalb des Gens oder im Fall von großen Varianten, mehrere bekannte Gene beinhalten. Variable CNV können SNPs Genotypisierung beeinträchtigen. Eine Deletion kann dazu beitragen, dass aneinandergrenzende SNPs den Verlust des heterozygoten Merkmals zeigen, da hemizygote<sup>8</sup> Genotypen wie homozygote beurteilt werden. Somit können Fehler entstehen, da SNPs in Regionen von CNV bei den frühesten Genotypisierungen exkludiert waren.

Genom Variationen beinhalten Veränderungen außer der Deletion auch die Inversionen, wo die Orientierung des DNA Segments verändert wird und balanzierte Translokationen, bei denen ein DNA Segment reziprok zwischen Chromosomen ausgetauscht wird. Bei Inversion und Translokation kommt es nicht zur Vermehrung oder dem Verlust von Sequenzen.

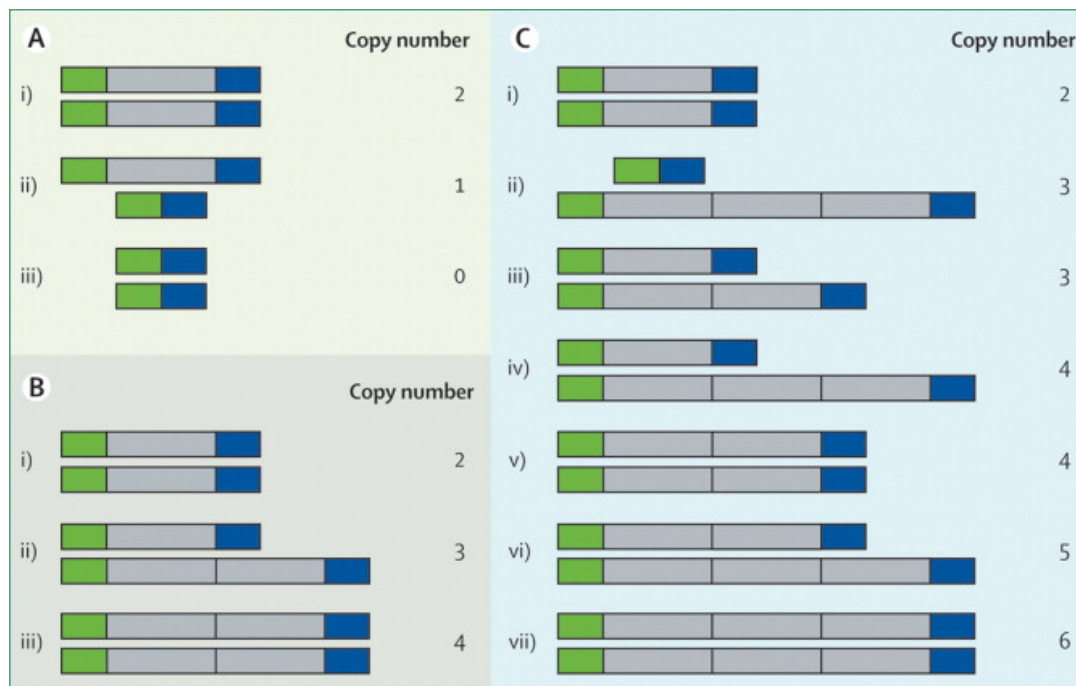
Als funktionelle Konsequenz kann man annehmen, dass bei CNV, die ein ganzes Gen betreffen, vor allem jene, die in wichtige Stoffwechselfunktionen eingebaut sind, eine Anfälligkeit für Erkrankungen auftritt [Wain 2009].

### **2.8.2 CNVs, die mit bekannten genetischen CVD assoziiert werden**

Die meisten CNVs, die mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert werden sind monogenetisch, treten in einer Frequenz von 1-5% auf, was ziemlich genau diesem Formenkreis der Erkrankungen in der normalen Bevölkerung entspricht. Eine Ausnahme ist das Lipoprotein A Gen (LPA), welches eine allgemeine hohe Variabilität zeigt. Die Region, die das LPA Gen auf Chromosom 6 beinhaltet ist auffallend variabel und polymorph. Dies deckt sich mit der bekannten Biologie von LPA, welches das atherogene Apolipoprotein kodiert.

---

<sup>8</sup> Ein nur einmal vertretenes Gen im sonst diploiden Chromosomensatz. (Roche Lexikon Medizin, 4.Auflage; © Urban & Fischer Verlag, 1999)



**Abbildung 3:** Diallel- multiallelische CNV

Diallelischer Locus (grau) und flankierende Regionen (grün und blau) mit Variationen, verursacht durch: A Deletion und B Duplikation, bei jeder Variation wird der Locus mit (i) normaler Copy Number, (ii) heterozygote Modifikation und (iii) homozygote Modifikation. C Multiallelischer Locus zeigt (i) normale Copy Number, (ii) multiple Duplikationen an einem Chromosom und Deletion am homologen Chromosom, (iii) Duplikation an einem und keine Deletion am homologen Chromosom, (iv) multiple Duplikationen an einem und keine Deletion am homologen Chromosom, (v) einmalige Duplikation an beiden Chromosomen, (vi) einmalige Duplikation an einem und mehrmalige Duplikation am homologen Chromosom, (vii) mehrfache Duplikationen an beiden Chromosomen. Multiallelische Assays messen diploide Copy Number und können daher nicht zwischen (ii) und (iii) oder (iv) und (v) unterscheiden. Es ist zu beachten, dass Duplikationen als aneinander grenzend betrachtet werden, was aber nicht immer der Fall ist. [Wain 2009].

Die Berücksichtigung von CNV wird die Suche nach genetischen Ursachen für CVD bereichern, es gibt bereits Karten von Gesunden, die fortlaufend revidiert werden und Wissenschaftlern öffentlich zur Verfügung stehen. Bisher konnten für komplexe Erkrankungen noch keine eindeutigen Ergebnisse gefunden werden, die ultimative Prüfung, ob CNV's in CVD Phänotypen involviert sind, wird groß angelegte Studien fordern, welche gut typisierte phänotypische Kohorten



beinhalten und reichhaltige sowie robuste Methoden braucht, um Individuen nach ihrem CNV zu klassifizieren [Pollex 2007].

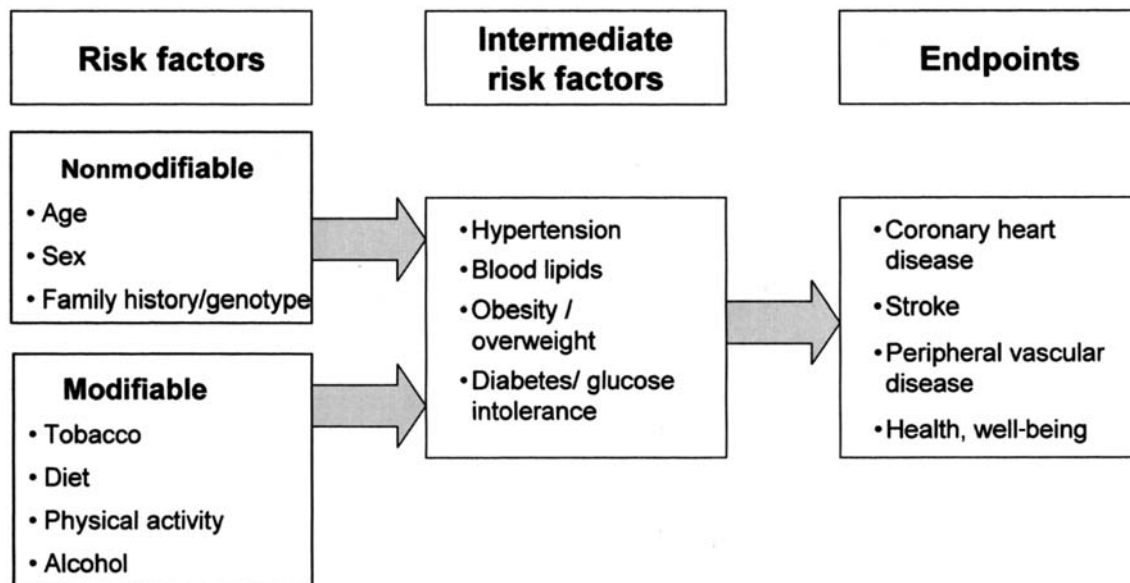
## **2.9 Risikofaktoren kardiovaskulären Erkrankungen**

Im Rahmen von prospektiver Langzeitstudien wie der Framingham-Studie, der Munster Heart Study (PROCAM) oder dem MONICA-Projekt der Weltgesundheitsorganisation WHO konnten Faktoren aufgezeigt werden, die mit einem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen einhergehen. Das Vorhandensein bedeutet nicht, dass sich eine CVD manifestiert; CVD kann auch ohne feststellbare Risikofaktoren auftreten. Besonders ungünstig ist daher eine Addition mehrerer Risikofaktoren, da in diesem Fall der Ausbruch einer solchen Erkrankung überadditiv ansteigt [Köntopp 2004].

Zu den Risikofaktoren gehören einerseits Hypertonie, Insulin Resistenz, Diabetes mellitus TypII, Adipositas und Hyperlipidämie, diese Faktoren schlagen sich im metabolischen Syndrom und der Atherosklerose nieder und führen zu den phänotypischen Krankheitsbildern wie MI, Herzfehler, Insult, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Nierenschaden. Diese Faktoren sind zu einem großen Anteil durch die Ernährung bedingt. Unbeeinflussbare Risikofaktoren sind die familiäre also genetische Disposition, das Alter und das Geschlecht [Köntopp 2004, Dominiczak 2005].

### **2.9.1 Hypertonie**

Diese Erkrankung hat eine Prävalenz von etwa 20% in den Industrieländern und trägt vermehrt zu Herzinfarkt, erworbenem kardialen Vitium, Schlaganfall und Nierenschaden bei. Da sowohl genetische als auch Umweltfaktoren zu dieser Erkrankung beitragen, ist es schwer, Studien über Hypertonie in der Bevölkerung durchzuführen. Die Erforschung der Hypertonieformen, die nach den Mendelschen Regeln vererbt werden und nur ein Gen betreffen, ist hingegen sehr aufschlussreich.



**Abbildung 4:** Graphische Darstellung Risikofaktoren  
Wozu sie führen können und welche Erkrankungen daraus entstehen -  
[Ordovas, J. M Am J Clin Nutr 2006; 83:443S-446S].

Jene Mutationen, die den Salz-Wasserhaushalt betreffen, sind für das Verständnis der Pathogenese der Hypertonie wichtig. Durch das Studium von Familien, die an schwerer Hypertension oder auch Hypotension leiden, wurden Gene entdeckt, die diese Stoffwechselwege regulieren. So konnte Wilson et al. beim Pseudohypoaldosteronismus II<sup>9</sup> zwei Gene feststellen, die für Proteine der WNK Familie der Serin-Threonin-Kinase kodieren.

Der Glukokortikoid-reagible Aldosteronismus ist autosomal dominant vererbt, die Hypertonie tritt in jungen Jahren auf und wird durch ein chimäres Gen verursacht, das den Promoter des 11- $\beta$  Hydroxylase-Gens und den kodierenden Teil des Aldosteronsynthase-Gens enthält. Es kommt zur unterdrückten Renin Aktivität und normalen oder erhöhten Aldosteronspiegeln, da das chimäre Gen ein abnormales Enzym produziert, das zu erhöhter Aldosteronproduktion führt [Gutmacher 2003].

<sup>9</sup> eine seltene Form der salzsensitiven Hypertonie mit einer milden hyperchlorämischen metabolischen Azidose mit Hyperkaliämie

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System ist kausal in die Hypertension, die durch Adipositas mit verursacht wird, verwickelt. Bei Gewichtsreduktion um etwa 5% hat man festgestellt, dass die erhöhten Spiegel für Angiotensinogen Renin, Aldosteron, Angiotensin-converting Enzym gesenkt werden, ebenso die Angiotensinogen Expression im Fettgewebe. Außerdem korrelierte der Plasma Angiotensinogenspiegel mit der Abnahme des Taillenumfangs und der systolische Blutdruck nimmt ab [Engeli 2005].

Da detaillierte Daten des Genoms von Menschen, Mäusen und Ratten verfügbar sind, ist es möglich geworden, die Entdeckungen im Genom von Tierspezies auf den Menschen zu übertragen. Im Falle der Hypertonie hat man an Tiermodellen, die für das Studium des Hochdrucks gezüchtet worden waren, erfolgreich quantitative Trait-Loci<sup>10</sup> identifiziert, die auch im menschlichen Genom relevant sind.

Man hat Ratten gezüchtet, die bestimmten Gruppen zugeordnet werden konnten, die „spontaneously hypertensive“, die „stroke prone spontaneously“ und die „Wistar - Kyoto“ Ratten. Dadurch konnte man durch gezielte Versuche einzelne Gene isolieren, die nicht nur verschieden exprimiert wurden sondern auch auf die kongene Region zurückgeführt werden konnten.

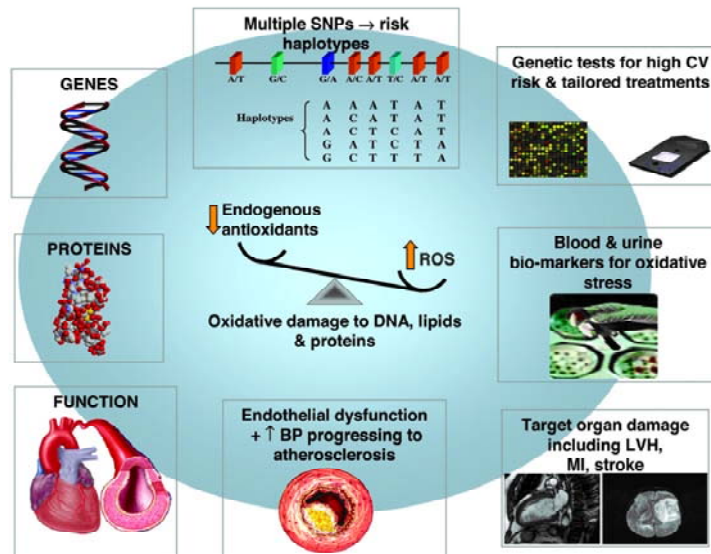
So konnte man etwa das Cd36 Gen isolieren, das für die Insulinresistenz mit verantwortlich ist und in einem modifizierten Experiment das Gen identifizieren, welches für die Glutathion S-Transferase  $\mu$  Typ 1 (Gstm1) kodiert. Dieses Gen ist in den Stoffwechselweg der endogenen Abwehr gegen oxidativen Stress involviert und bei hypertensiven Ratten wird das oben genannte Enzym weniger exprimiert als bei normotensiven. Man schließt daraus, dass die verminderte Abwehr gegen ROS (reaktive Sauerstoff Radikale), die bei Hypertension vermehrt gebildet werden und die verminderte Expression der Gstm1 dazu

---

<sup>10</sup> Diese Region auf der DNA wird mit einem spezifischen phänotypischen Merkmal verbunden, QTLs werden oft auf verschiedenen Chromosomen gefunden, somit kann man bestimmte komplexe Phänotypen mit spezifischen Regionen am Chromosom verbinden. Dies dient zur Identifikation von Aktion, Interaktion, Anzahl und präziser Lokalisation dieser Regionen.  
[<http://www.nature.com/scitable/topicpage/Quantitative-Trait-Locus-QTL-Analysis-53904>, (15.03.2010)]

beiträgt, die pathophysiologischen Veränderungen, die bei Hypertonie auftreten, einzuleiten und das Fortschreiten der Schädigungen wie Gefäßwandveränderungen und Nierenschaden zu unterstützen [Dominiczak 2005].

#### Cardiovascular continuum and the oxidative stress pathway



Dominiczak, A. F. et al. Hypertension 2005;45:636-642

Copyright ©2005 American Heart Association

#### Abbildung 5: Kardiovaskuläres Kontinuum

Kardiovaskuläres Kontinuum und der Stoffwechselweg des oxidativen Stresses. "Pathwayomics" hier als kardiovaskuläres Kontinuum dargestellt, führt von der Abfrage (interrogation?) verschiedener SNPs in Genen, die in den oxidativen Stoffwechselweg inkludiert sind, zu den Risiko Haplotypen und zukünftigen genetischen Tests. Weiters wird gefordert, dass multiple, subtile genetische Polymorphismen mit Umweltfaktoren interagieren und eine chronische Imbalance von ROS und endogenen Antioxidantien bewirken. Diese funktionellen Abnormalitäten fördern systemische endotheliale Dysfunktion wie Hypertension und andere CVD Risikofaktoren, welche in umgekehrter Richtung zu fortschreitender Atherosklerose und Organschädigungen führen. CV: Kardiovaskulär, BP: Blutdruck, LVH: linksventrikuläre Hypertrophie, MI: Myokardinfarkt.

### 2.9.2 Adipositas

Fettleibigkeit stellt das sechsthöchste Risiko für alle chronischen Erkrankungen weltweit dar. 2006 waren über eine Milliarde Erwachsene und 10% der Jugendlichen übergewichtig. (Narkiewicz 2006)

Adipositas, vor allem die zentrale, wird mit Hypertension und erhöhtem kardiovaskulärem Risiko in Verbindung gebracht. Schätzungen, die Populationsstudien entnommen worden sind, zeigen, dass zwei Drittel der Hypertonie auf Fettleibigkeit zurückzuführen sind. Vor allem die abdominelle Adipositas ist mit Schuld an der koronaren Herzkrankheit, Schlaganfall und Stauungsinsuffizienz des Herzens.

Metabolische Störungen, die durch Adipositas verursacht werden und Beeinträchtigung der kardiovaskulären Funktion, können schon in jungen Jahren vorhanden sein, fortschreiten und für Jahrzehnte latent vorhanden sein, bevor es zur klinischen Manifestation kommt. Es ist denkbar, dass abnorme metabolische Störungen, die bei jungen Menschen mit Fettleibigkeit vorhanden sind, Hypertension und Atherosklerose ohne weitere Risikofaktoren fördern [Narkiewicz 2006].

Diese Hypothese war auch Gegenstand einer klinischen Studie, welche die Beziehung zwischen Adipositas und subklinischer Verkalkung der Koronararterien bei gesunden fettleibigen Personen untersuchte. Die Studiendauer betrug acht Jahre und die Studienteilnehmer hatten keinen Diabetes mellitus. Ähnlich dem nationalen Cholesterol Education Program für Erwachsene, wo zusätzlich zu den traditionellen Risikofaktoren, die im Framingham Risiko Score für CVD aufscheinen, das Übergewicht mit einbezogen wurde, teilte man die Studienteilnehmer in zwei Gruppen ein, die mit dem Risiko für CVD von unter und jene mit über 10% . Das Resultat war erstaunlich, da die Gruppe mit niedrigerem Risikoscore eine Assoziation zur progredienten Verkalkung der Herzkranzgefäße zeigte, die Gruppe mit erhöhtem

Risiko aber nicht. Es könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Parameter für Fettleibigkeit lediglich aus dem BMI und dem Taillenumfang festgelegt wurde, eine Unterteilung in abdominelle und nicht abdominelle Adipositas in dieser Studie fehlte [Cassidy 2005].

In einer epidemiologischen Studie wurde an 54.783 adipösen Menschen im Alter von

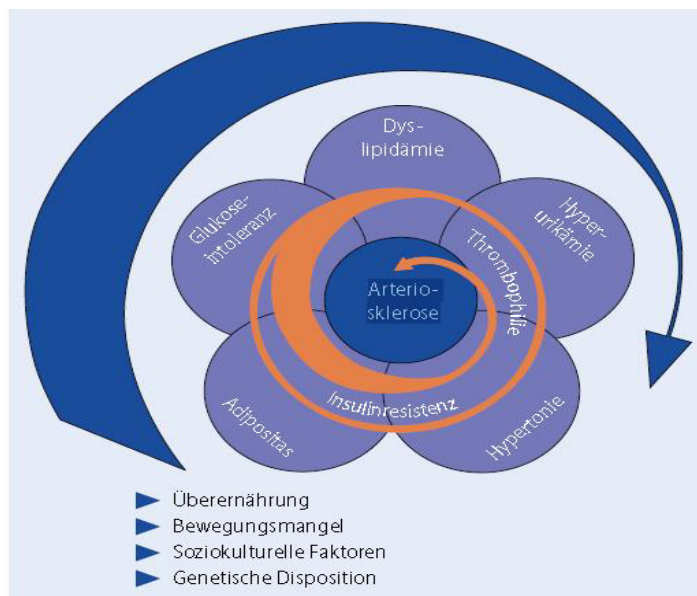
50 - 64 Jahren untersucht, ob ein gesunder Lebensstil bei gleichbleibender Adipositas das Risiko an einem akuten koronaren Syndrom (ACS) zu erkranken, senkt, die Dauer des Betrachtungszeitraums war 7,5 Jahre. Es wurde der erhöhte BMI in Prozent gestaffelt, (jener zwischen 25 bis 29,9) ab einem BMI von 30 wurden die Teilnehmer unter schwerer Adipositas geführt. Ein BMI von 25 wurde als normales Gewicht gesehen. Die Studie zeigte, dass das Risiko für ACS mit zunehmenden BMI Körperliche Aktivität, Ernährung gemäß der mediterranen Diät, Meidung von Alkohol und Zigaretten Rauchen konnte das Risiko leicht senken aber nicht verhindern. Bei den Menschen mit schwerer Adipositas konnte keine Ernährungsform das Risiko senken [Jensen 2008].anstieg.

### **2.9.3 Metabolisches Syndrom**

Das metabolische Syndrom wird unterschiedlich definiert. Die Version des Adult Treatment Panel III (ATP 3) hält es tatsächlich für ein Syndrom, welches eine Bündelung kardiovaskulärer Risikofaktoren ist, das mehr als eine Ursache hat. Die Internationale Diabetes Federation (IDF) sagt: "Die zentrale Fettleibigkeit ist ein früher Schritt in der etiologischen Kaskade, die zum vollen metabolischen Syndrom führt." Es ist offensichtlich, dass die individuellen Abnormalitäten wie Glukose Intoleranz, hohe Triglyceridspiegel oder niedriges HDL Cholesterin (HDL-C) und hoher Blutdruck mehr als eine Ursache haben können, allerdings gibt es ausreichend Beweise, dass Insulinresistenz und kompensatorische Hyperinsulinämie alle Risikofaktoren, die das metabolische Syndrom inkludiert,

durch die Wirkung auf verschiedene Stoffwechselwege erhöht werden [Reaven 2008].

Das metabolische Syndrom kann man schon in den oberen Bevölkerungsschichten der europäischen Vergangenheit wie Renaissance und Barockzeit finden, wo der Nahrungsüberschuss und Bewegungsmangel ebenso wie heute dazu führten.



Der Internist 2 • 2007 |

**Abbildung 6:** Circulus viriosus des metabolischen Syndroms [Hanefeld 2007]

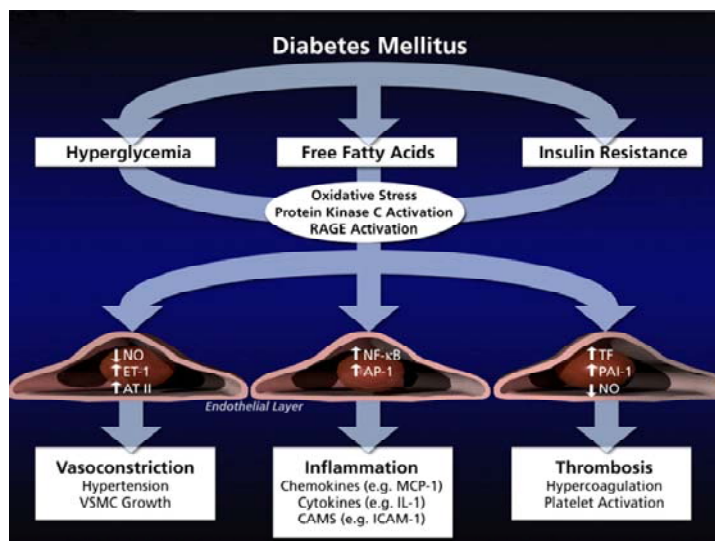
#### 2.9.4 Diabetes mellitus TypII (DM II)

Diese Erkrankung betrifft 100 Millionen Menschen weltweit, 5-10% leiden an DM I, während der Rest an DM II erkrankt ist. Man kann annehmen, dass diese Erkrankung durch den Lebensstil unserer Zeit, der zur Adipositas beiträgt, noch weiter wachsen wird. Die makrovaskuläre Manifestation beinhaltet Atherosklerose und die Kalzifizierung der Media der Gefäße. Die mikrovaskuläre Konsequenz daraus ist Retino- und Nephropathie.

Bei Diabetes konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte NO Produktion stattfindet, die - wie im Kapitel über das Endothel beschrieben wird - mit schuld an den atherosklerotischen Gefäßveränderungen ist. Die

Bioverfügbarkeit von NO reflektiert eine Balance zwischen NOS und seinem Abbau, vorzugsweise durch Sauerstoffradikale. Viele der bei Diabetes vorkommenden Störungen des Stoffwechsels wie Hyperglykämie, exzessiver Freisetzung von freien Fettsäuren und Insulinresistenz induzieren die pathologische Vorgänge in den Endothelzellen [Creager 2003].

The metabolic abnormalities that characterize diabetes, particularly hyperglycemia, free fatty acids, and insulin resistance, provoke molecular mechanisms that alter the function and structure of blood vessels



Creager, M. A. et al. Circulation 2003;108:1527-1532

Copyright ©2003 American Heart Association

**Abbildung 7:** Metabolische Gegebenheiten, die Diabetes charakterisieren, besonders Hyperglykämie, freie Fettsäuren und Insulinresistenz, sie provozieren Veränderungen in der Funktion und Struktur der Gefäße durch molekulare Mechanismen

### 2.9.5 KHK und Diabetes

Diabetes erhöht das Risiko an KHK zu erkranken um das 2-4fache. In einem 2003 erschienen Bericht des Adult Treatment Panel des nationalen Cholesterin Erziehungsprogramms wurde DM II in Verbindung mit MI gebracht. Es stellte sich heraus, dass Diabetiker mit MI zu 45% sterben, in einem Zeitraum von 10 Jahren zu 75%. Verglichen zu koronarkranken Patienten ohne Diabetes ist jedes Ereignis, das aus dieser Erkrankung herrührt, mit einem schlechteren Ausgang



verbunden, bei instabiler Angina pectoris entwickeln Diabetiker viel leichter einen MI, das konnte schon 1999 in einer Studie von Kjaergaard nachgewiesen werden. (Lüscher 2003)

In einem Beitrag der OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) wurde eine Studie in sechs Nationen durchgeführt, die zeigte, dass bei Patienten mit instabiler Angina pectoris die Letalität um 57% steigt. (Lüscher 2003)

### **2.9.6 Cerebrovaskuläre Erkrankungen**

Durch Diabetes wird das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden stark erhöht. Das wurde in Studien bewiesen, wie z.B. der Baltimore-Washington Kooperationsstudie über junge Schlaganfälle. Hier zeigte sich ein 10-fach erhöhtes Risiko bei Patienten unter 44 Jahren einen Insult zu erleiden, wenn sie an DM erkrankt waren, bei den weißen Männern konnte man sogar 23-mal höheres Risiko feststellen. Die Mortalität ist bei Diabetikern nach einem Schlaganfall erhöht, die Gefahr eines wiederkehrenden Insults ebenso wie auch die Demenz, die im Anschluss an dieses cerebrale Ereignis auftreten kann (Lüscher 2003).

### **2.9.7 Periphere arterielle Verschlusskrankung (PAVK)**

Hier wird die Inzidenz und Schwere der Ischämie der Extremitäten um das 2-4fache erhöht. In den Kohorten der Frammingham und Rotterdam Studien fand man bei DM vermehrt das Fehlen von Fußpulsen und einen verminderten Knöchel-Arm Index<sup>11</sup>. Auch das Krankheitsbild der Claudicatio intermittens<sup>12</sup> ist bei Diabetikern dreimal so hoch (Männer) und achtmal so hoch (Frauen) als bei nicht an DM erkrankten Patienten mit Durchblutungsstörungen. Der Grund einer

---

<sup>11</sup> Eine Doppleruntersuchung, bei der ein Quotient aus dem Blutdruck (am Oberarm und Oberschenkel gemessen) ermittelt wird, Daraus erhält man Aufschluss über die Durchblutung.

<sup>12</sup> Plötzlich auftretende Schmerzanfälle beim Gehen

Amputation der unteren Extremität bei Diabetikern ist die an erster Stelle stehende Ursache für diesen operativen Eingriff in den USA [Lüscher 2003].

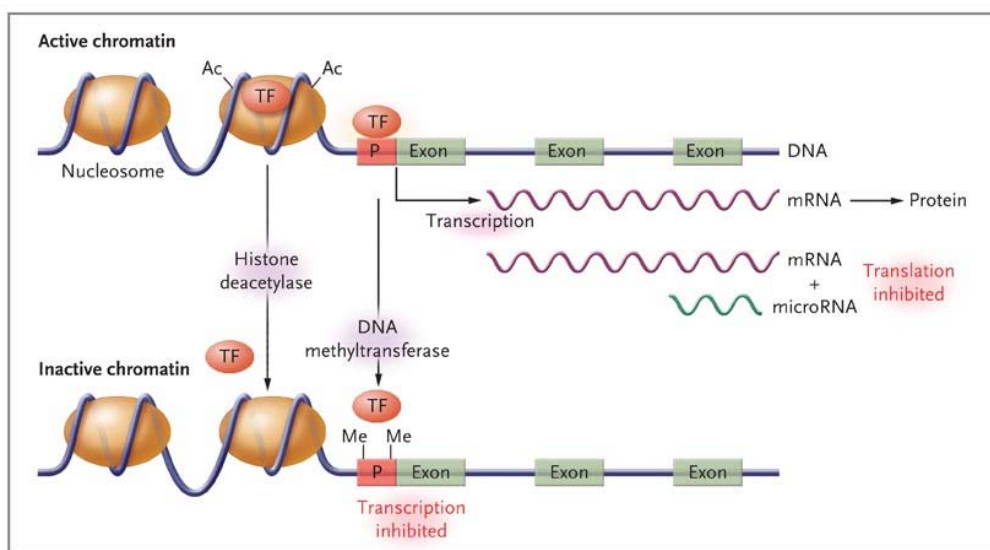
### **2.9.8 Observationen in utero und im frühen Kindesalter**

Die epidemiologischen Beobachtungen, dass kleine Körpergröße oder Magerkeit bei Neugeborenen und während des Säuglingsalters mit einer erhöhten Rate an KHK, Insult, DM II, Fettleibigkeit, dem metabolischen Syndrom und Osteoporose im Erwachsenenalter einhergehen, wurde in zahlreichen Studien beobachtet und in Replikationsstudien bestätigt. Perinatale Ereignisse scheinen Effekte zu produzieren, die unabhängig von extrinsischen Faktoren im erwachsenen Alter sind oder aber durch andere Risikofaktoren vergrößert werden.

Intrauterines, langsames Wachstum kann während der Entwicklung mit erhöhter Allokation von Nahrungsstoffen in das Fettgewebe assoziiert werden. Das, so nimmt man an, führt zur rascheren Gewichtszunahme im Kindesalter. Wenn dies zu Adipositas führt, ist der Risikofaktor für CVD Hypertension und Diabetes mellitus II vorhanden. Es besteht eine ständige Korrelation zwischen Geburtsgewicht und zukünftigem Risiko, nicht nur für extremes, sondern auch für normales Gewicht. Frühgeborene, unabhängig von der Körpergröße am Geburtstermin, zeigen vermehrt Insulinresistenz und Glukoseintoleranz präpubertär. Das kann sich in der Entwicklung fortsetzen und auch noch von Hypertonie begleitet werden. Nicht nur Unter- sondern auch Übergewicht von Neugeborenen bei der Geburt ist mit Risiken belastet. So ist bekannt, dass die Hyperglykämie der Mutter zur fötalen Hyperinsulinämie und Fettdisposition führen kann und es gibt Daten, die zeigen, dass Kinder adipöser Mütter oder von Müttern mit Diabetes selbst vermehrt metabolische Störungen, sowohl in der Kindheit als auch im späteren Leben haben können. Die Relation der pränatalen Ernährung und metabolischen Erkrankungen ist wie ein U geformt, mit erhöhtem Risiko an beiden Enden der Extreme. (Gluckman 2008)

## 2.9.9 Epigenetische Mechanismen

Die Beweislast, dass epigenetische Mechanismen für die gewebespezifische Differenzierung verantwortlich sind, wächst ständig. Hierzu gehören koordinierte Wechsel in der Methylierung von Cytidin- und Guanosin - Nukleotiden in der Promotorregion spezifischer Gene, Wechsel in der Chromatinstruktur durch Histon - Acetylierung und -Methylierung und posttranskriptionelle Kontrolle durch Mikro-RNA (Erklärung bei Fussnote 34).



**Abbildung 8:** Regulation der Genexpression durch Epigenetische Prozesse

Epigenetische Modifikation von Histonen oder DNA, die selbst den Zugang von Transkriptionsfaktoren (TFs) zur DNA Sequenz kontrollieren, wobei die Rate tRNA zu mRNA moduliert wird. Bei der Transkription aktives Chromatin (oben) charakterisiert durch die Gegenwart von Acetyl Gruppen (Ac) auf spezifischen Lysinresten des Core Histons im Nucleosom, welches die Bindung an DNA herabsetzt, resultiert in einer offeneren Chromatinstruktur, welche Zutritt von Transkriptionsfaktoren gewährt. Zusätzlich kommt eine Cytidin-Guanosin (CpG) Sequenz in der Promotor Region von aktiv transkribierten Genen, gewöhnlich unmethyliert, welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren gestatten. Transkriptionell inaktives Chromatin (unten) ist durch Histon Deacetylierung, Promotor CpG Methylierung (angezeigt durch Me) und herabgesetzte Bindung von Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Eine weitere Ebene von epigenetischer Kontrolle wird von Micro RNA Molekülen (19-22 Nukleotide lang) gewährt, welche die komplementäre Sequenz am 3'Ende der mRNA binden und die Menge der Proteinsynthese reduzieren [Gluckmann 2008].

Solche Modifikationen sind gen- und zelltypspezifisch, man nimmt an, dass die Spezifität direkt zwischen DNA und kleinen RNA geregelt wird. Nach der Befruchtung kommt es zu einer ausgedehnten epigenetischen Reprogrammierung, gewisse Methylierungsmuster, die mit Imprinting<sup>13</sup> assoziiert sind, bleiben. Durch die Entwicklung induzierte epigenetische Modifikationen der DNA sind normalerweise stabil während der Mitose, die das ganze Leben hindurch weitergeht. Man hat in Tierversuchen an Ratten während der Tragezeit und danach Versuche mit externen Reizen, dazu zählten auch Fütterungsvarianten, gemacht und festgestellt, dass daraus Veränderungen in der Methylierung der Promotorregion von Genen entstanden. Das beeinflusste direkt oder indirekt Genexpression in Stoffwechselwegen, die mit einer Reihe von physiologischen Prozessen in Verbindung stehen.

Die molekulare Epidemiologie hat es noch nicht geschafft, die metabolischen Erkrankungen genetisch zu verifizieren, es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass man auf dem Weg über die Epigenetik einige plausible Erklärungen dafür findet [Gluckmann 2008].

---

<sup>13</sup> „bewirkt in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft der Gene deren unterschiedliche Genaktivität, d. h., einige wenige Gene sind nur auf den von der Mutter geerbten Chromosomen aktiv, andere Gene nur auf den vom Vater geerbten Chromosomen. Auf biochemischer Ebene beruht das Imprinting vermutlich auf Methylierung der DNA“. [[http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/patinfo/glossar\\_f.html](http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/patinfo/glossar_f.html), (16.03.2010)]

### 3 DAS GEFÄSSENDOTHEL

Die Erforschung der Biologie der Gefäße hat in den letzten 50 Jahren mehrere große Veränderungen erfahren. Zuerst hat man mittels physiologischer Methoden versucht, den Phenotyp zu verstehen, wobei man sich auf den Tonus der Gefäße und die neurohumoralen Bestimmungsgrößen sowohl bei gesunden als auch kranken Gefäßen konzentrierte.

25 Jahre später konnte man durch die Fortschritte der biochemischen und molekularen Analysen wie etwa der Einführung von Zellkulturen, mikroanalytischer Methoden und neuer Reagenzien wesentlich bessere Rückschlüsse auf den Phänotyp ziehen. In den letzten 10 Jahren kam es zu einer weiteren Wende: durch das Human Genom Projekt hat man Zugang zu einem großen molekularen Datensatz, zusammen mit der Expressions-Array-Analyse, Proteomik und Metabolomik könnte man sowohl Biologie als auch Pathobiologie der Gefäße erforschen und verstehen, wiewohl die derzeitige herkömmliche reduktionistische Analyse, die bei diesen Datenmengen angewendet wird, eine gewisse Einschränkung darstellt. Es werden einzelne Bestimmungsgrößen in einer Kette von Ereignissen festgestellt und dadurch übersieht man, dass das biologische System ein komplexes ist, wo einzelne Parameter nicht ohne Veränderung anderer vorkommen [Loscalzo 2003].

Die neuesten Studien über Atherosklerose stellen das entzündliche Geschehen an der Gefäßwand als den Beginn pathologischer Veränderungen in den Vordergrund [Packard 2008, Demer 2008].

Früher sah man die Stoffwechselstörung des Cholesterols als primäre Ursache für Gefäßwandveränderungen. Um die Artherogenese als komplexe Erkrankung zu sehen, muss man die Risikofaktoren zusammen mit dem molekularem Austausch zwischen Blut und Gefäßwand betrachten, die Entzündung spielt in jedem Stadium der Erkrankung eine große Rolle [Libby 2005].

Es konnte auch in groß angelegten Genomstudien gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen der Erkrankung der Herzkranzgefäße (CAD), entzündlichen Vorgängen und dem Immunsystem besteht [Watkins 2006]

Bairam Prasad (2002) zeigte in einer Studie an 375 Patienten, dass Immunoglobulin-G Antikörpertiter gegen Cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Hepatitis A Virus und Herpes Simplex Virus-1 nach Gabe von Azetylcholin den Widerstand der Gefäßwände erhöhte und positiv mit der Schwere der kardiovaskulären Erkrankung korrelierte. Besonders deutlich sah man das mit Antikörpern gegen Hepatitis A. Wenn man Endothelzellen in Zellkulturen mit Zytomegalie oder anderen pathogenen Keimen versetzt, induziert man die Expression von Gewebefaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen und bewirkt damit Veränderungen im Phänotyp, die zur Einleitung der Atherogenese führen, beziehungsweise pathologische Veränderungen des vorgeschädigten Endothels verschlimmern, was in Tiermodellen gezeigt werden konnte [Vita 2002].

Das Endothel ist das größte Organ des Körpers, es ist eine einlagige Zellschicht, die den Intravaskulärraum von den Geweben und Organen trennt. Es ist nicht nur als physikalische Barriere zu betrachten, sondern auch als eigenständiges Organ, das stark differenziert und metabolisch hochaktiv ist. Es registriert mechanische Stimuli wie Druck und Scherkräfte, weiters wird es durch hormonelle Stimuli wie z.B. vasoaktive Substanzen beeinflusst. Wichtige Funktionen sind die Hemmung der Anlagerung von Leuko- und Thrombozyten, die Kontrolle der endothelialen Permeabilität, die Initiierung der Angiogenese und die Regelung des Gefäßtonus. Als Antwort auf Stimuli setzt es Substanzen frei, welche die vasomotorische Funktion regulieren, entzündliche Prozesse initiieren oder die Homöostase beeinflussen.

Zu den vasodilatorischen Substanzen gehören Nitroxid (NO), Prostacyclin und verschiedene Substanzen, die einen hyperpolarisierenden Effekt durch

Einwirkung auf den Calciumstoffwechsel der glatten Gefäßmuskulatur haben (Endothelium derived hyperpolarizing factor = EDHF) sowie C-type Atrial natriuretisches Peptid (c-ANP) [Endemann 2004, Ruebe 2006].

<b>Vitale Funktionen des vaskulären Endothels</b>
Blutkompatibler Container
Selektive Permeabilitätsbarriere
Erkennung und Umsetzung von aus dem Blutkompartiment stammenden zellulären Signalen -
Quelle und Ziel von Mediatoren biologischer Reaktionen
Sensor und Integrator des lokalen pathophysiologischen Milieus
Dynamische Regulation von Hämostase und Thrombose
Regulation des vaskulären Tonus
Regulation des vaskulären Wachstums und von Remodelling Prozessen -
Inflammatorische und immunologische Reaktionen

**Tabelle 2:** Vitale Funktionen des vaskulären Endothels

### 3.1 Stickoxid:

Stickoxid ist ein Gas und seine Bildung als Signalmolekül ist sowohl für intra- als auch interzelluläre Vorgänge wichtig. Die Halbwertszeit ist 2-30 Sekunden, daher kann es vom Syntheseort nur in umliegende Gewebe sowie Zellen einwandern [Löffler 2007].

1980 berichtete „Nature“ in einem Artikel, dass man eine Substanz gefunden hat, die am intakten Gefäßendothel gebildet wird, labil ist und als Antwort auf Zusatz einer bestimmten Menge Azetylcholin die glatte Muskulatur relaxiert. Der Versuch wurde in vitro mit einer ringförmig zugeschnittenen Aorta von Hasen durchgeführt [Furchgott 1980].

Dieser Faktor wurde als Endothelial Dependent Relaxation Factor bezeichnet (EDRF), der in Folge als Stickoxid identifiziert werden konnte. Von da an wurde der Syntheseweg rasch aufgeklärt und man stellte fest, dass NO nicht nur für die Regulation des Gefäßtonus sondern auch bei weiteren regulatorischen Prozessen eine wichtige Funktion einnimmt. NO wird durch Stickoxid-Synthasen (NOS) gebildet, die in drei Isoformen vorkommen und in verschiedenen Geweben gebildet werden: Diese Isoenzyme werden von unterschiedlichen Genen kodiert.

Isoformen der NO-Synthasen
Typ 1 = neuronale NOS [nNOS]; Chromosom 12
Typ 2 = induzierbare NOS [iNOS], Chromosom 17
Typ 3 = die endotheliale, exprimierte NOS [eNOS] Chromosom 7:

**Tabelle 3:** Isoformen der NO-Synthasen

nNOS und eNOS werden konstitutiv exprimiert, die iNOS wird durch entzündliche Stimuli induziert [Dreves 2009].

Die Regulation der eNOS ist komplex:

Als wichtigsten Faktor für die kontinuierliche Bildung von NO werden die Scherkräfte, die das fließende Blut auf das Endothel der Gefäße ausübt, betrachtet. Es kommt zur Phosphorylierung der eNOS und dadurch wird die Enzymaktivität reguliert. Wie die Details der Aktivierung im Einzelnen ablaufen, ist Gegenstand aktueller Forschung [Dimmeler 1999, Da Silva 2009].

Einfach betrachtet bildet die eNOS aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) aktiviert durch eine Erhöhung der Calcium/Calmodulin Konzentration unter Beteiligung von Cofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und NADPH, NO und L-Citrullin. Da dieser Vorgang redox sensitiv ist, spielt der Redoxstatus der Zelle eine große Rolle. Zur Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße diffundiert NO in die Muskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatcyclase



(katalysiert die Reaktion:  $\text{GTP} \rightarrow \text{cGMP}$  und Pyrophosphat + Muskelrelaxation) [Löffler 2007, Rösen 2002, Anggard 1994].

Das Enzym selbst unterliegt posttranslationalen Modifikationen; die Produktion von NO muss sorgsam gemessen werden, um auf die jeweiligen physiologischen und pathophysiologischen Stimulationen zu reagieren. Daher gibt es viele voneinander abhängige Kontrollmechanismen und Signalwege, die an den verschiedenen Stellen der Bildung von NO wirksam sind. eNOS und mRNA Spiegel werden sowohl bei der Transkription als auch danach kontrolliert und epigenetische Mechanismen scheinen die gewebsspezifische Expression von eNOS zu modulieren. Zu den nach der Translation stattfindenden Veränderungen, die am eNOS Protein stattfinden, zählen:

### 3.1.1 Acylierung

Wenn eNOS acyliert<sup>14</sup> worden sind, werden sie in den Caveolae des Plasmalemmas ruhender Zellen gespeichert. Caveolae sind mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert und weisen dadurch eine geringere Fluidität der Membran auf. Diese Art der flüssigen Phase der Membran ermöglicht Protein-Protein und Protein-Lipid Interaktionen für zelluläres Signaling<sup>15</sup>. Diverse Rezeptor- und Signalproteine, die von den Caveolae produziert werden, ermöglichen damit eNOS, in der richtigen Position, in an- auf- oder absteigenden Signalwegen involviert zu sein.

### 3.1.2 Intrazelluläre Calcium/Calmodulin Bindung

Der intrazelluläre Calciumspiegel ist ein bestimmender Faktor für die Aktivität der eNOS, da die maximale katalytische Funktion des Enzyms die Bindung an Calmodulin erfordert, dadurch wird der Elektronentransfer zwischen der

---

<sup>14</sup> Die N-terminale Aminosäure der meisten cytosolischen Proteine wird cotranslational acetyliert. In ausgewählten Proteinen können die  $\alpha$ -Aminogruppe eines Glycinrestes oder Thiolgruppen benachbarter Cysteinreste mit Myristin bzw. palmitinsäure modifiziert werden [Löffler 2007].

<sup>15</sup> Signaltransduktion

oxidierenden und reduzierenden Dömane des Enzyms ermöglicht. Es gibt verschiedene Substanzen wie Bradykinin und Azetylcholin, welche die Bindung an Calmodulin fördern.

### **3.1.3 Phosphorylierung**

Das Netzwerk von Phosphorylierung und Dephosphorylierung ergänzt als weiterer regulatorischer und posttranslationeller Einfluss die Aktivität der eNOS, wobei diese Aktivität an bestimmten Schlüsselstellen wie Serin und Tyrosinresten stattfindet und unterschiedliche Wirkungen auslöst. Durch Aktivierung spezieller Proteinkinasen führen Substanzen wie Bradykinin, Sphingosin-1-Phosphat, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und auch Insulin zur Phosphorylierung.

### **3.1.4 S-Nitrosylierung**

Durch reversible Schwefel-Nitrosylierung kann posttranslational eine weitere Kontrolle wirksam werden. Während die Nitrosylierung das eNOS Enzym inhibiert, geht die Denitrosylierung mit einer Erhöhung der Enzymaktivität einher. Welcher Mechanismus dieser Reaktion genau unterliegt, ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

Da so viele Reaktionen mit der Bildung von NO verquickt sind, ist das Gleichgewicht der NO Produktion leicht zu beeinflussen und eine endotheliale Dysfunktion durch viele Faktoren auslösbar [Dudzinski 2007].

### **3.1.5 eNOS Expression**

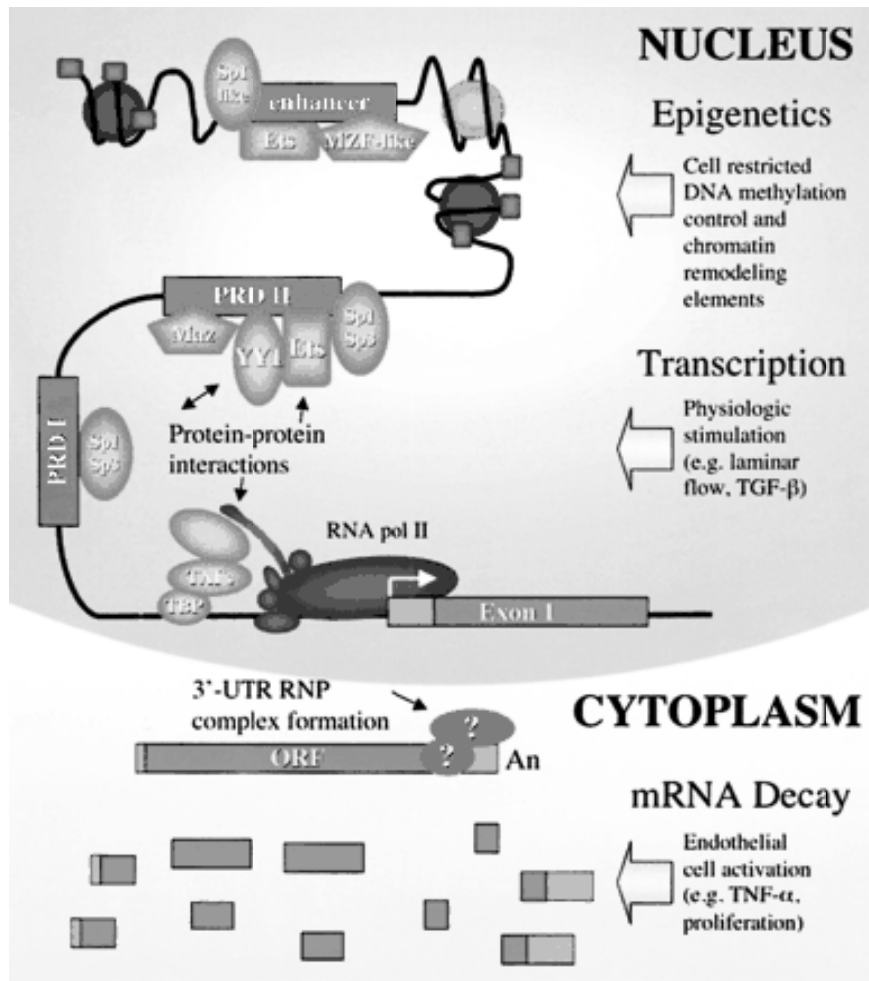
Die eNOS Expression wird von der basalen Transkription im Core Promotor gestaltet und beinhaltet Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen. Auch Mechanismen, die Chromatin spezifisch sind und epigenetische Ereignisse regulieren, gestalten die Expression der eNOS im Stadium der Transkription, dieser Vorgang ist auf Zellen beschränkt. Man konnte in Zellkulturen

nachweisen, dass die Transkriptionsrate der eNOS ansteigt, wenn die Zellen Scherkräften ausgesetzt worden sind oder wenn zum Beispiel TGF- $\beta$  (transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ) zugesetzt wurde. Durch Modelle wie Entzündung, Verletzung, oxydiertes LDL und Hypoxie wurden die posttranskriptionellen Mechanismen der eNOS Expression als wichtiger regulatorischen Stoffwechselweg erkannt, der die Verminderung des NO Gehaltes in diesen Situationen gut erklären konnte [Tai 2004].

In einer Meta Analyse von 26 Studien, die 23028 Teilnehmer beinhaltete, wurde die Rolle des Polymorphismus der eNOS untersucht, da man annimmt, dass dieser mit einem erhöhten Risiko von ischämischen Herzerkrankungen (IHD) verbunden ist. Es wurden Fall-Kontroll Studien, welche zwischen Protein GLU298ASP<sup>16</sup>, 786T/C dem Intron-4 Polymorphismus, und IHD eine Assoziation herstellten, herangezogen. Voraussetzung für die Studie war die Hypothese, dass die Reinerbigkeit für eNOS Asp298, das \_786C Allel in der Promotorregion oder das Intron-4 Allel, mit einem erhöhten Risiko an IHD in Verbindung gebracht werden könnte. Es wurde festgestellt, dass sowohl für eNOS Asp298 als auch für die Homozygotität des Intron-4a Allel ein signifikanter Zusammenhang besteht. Bei dem \_786C Allel konnte man keine Assoziation zu IHD finden. Polymorphismus im eNOS Gen kann als moderates Risiko für ischämische Herzerkrankungen gesehen werden [Casas 2004].

---

<sup>16</sup> Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/266648> (14.03.2010)



**Abbildung 9:** Denkmuster für die Kontrolle der eNOS Gen-Expression Tai et al 2004  
Das Gleichgewicht ist für die mRNA der eNOS ist in mehreren Ebenen geregelt: epigenetisch, transkriptional und posttranskriptional

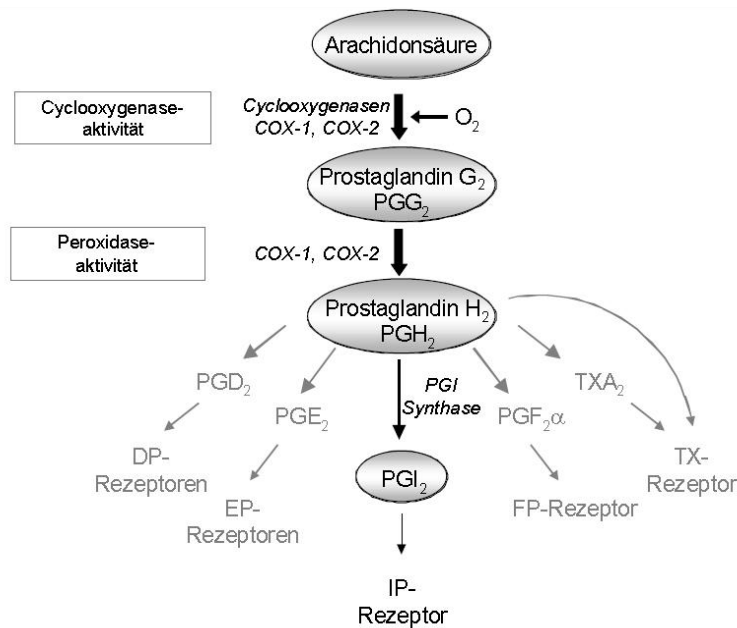
### 3.2 Prostacyclin

Prostaglandine wie PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGD<sub>2</sub>, Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (TX)A<sub>2</sub> sind Lipid-Autakoide<sup>17</sup>, sie werden aus der endogenen Arachidonsäure gebildet. Diese ist eine mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäure und Bestandteil der Membranphospholipide. Verschiedene Stimuli wie Zellschädigung, Absinken des pH-Wertes, Entzündungsmediatoren bewirken eine Freisetzung aus der Membran und sie wird über verschiedene Zwischenstufen zu Prostaglandinen

<sup>17</sup> Chemisch heterogene, vornehmlich kurzlebige Substanzen, die durch auto- und parakrine Mechanismen vasoaktiv wirksam sind.

metabolisiert (siehe dazu Abbildung 10). Das Enzym Cyclooxygenase (COX, Prostaglandin H Synthase) kommt in zwei Isoformen COX-1 und COX-2 vor und setzt in einem zweistufigen Prozess die Arachidonsäure zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) um, danach folgt mittels Peroxidase die Umwandlung in Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Durch unterschiedliche Enzyme wird dann zell- bzw. gewebsspezifisch PGH<sub>2</sub> zu PGI<sub>2</sub> und anderen Prostaglandinen sowie Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgesetzt. Diese werden in den Zellen nicht gespeichert, sondern sofort in den Kreislauf eingeschleust. PGI<sub>2</sub> wird bei Entzündungsreaktionen vermehrt ausgeschüttet, es konnte nachgewiesen werden, dass es die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur hemmt. Die Bildung von PGI<sub>2</sub> ist bei Verletzungen der Gefäßwand erhöht. PGI<sub>2</sub> wirkt meist über den I Prostacyclin-Rezeptor (P), der zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) des Rhodopsin-Typs gehört. Dadurch wird die membrangebundene Adenylzyklase aktiviert und darauffolgend der Second Messenger cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) gebildet.

cAMP triggert nun eine Schar von zellulären Antworten, dazu gehören, was das Gefäßendothel betrifft: Vasodilatation, Relaxation der glatten Muskulatur, Induktion der Bildung von Thrombomodulin und Minderung der Thrombozytenaggregation. Es ist ein Gegenspieler des von den Thrombozyten ausgeschütteten Thromboxan A<sub>2</sub>, welches ein Vasokonstriktor ist und die Aggregation der Thrombozyten forciert. 1994 gelang erstmals die Klonierung des humanen (h) IP [Boie et al., 1994; Gen-Bank Nr. L29016]. Die Halbwertszeit des Prostacyclins ist kurz 3-5 Minuten [Di Francesco 2009, Nilius 2001, Bolz 1997].



**Abbildung 10:** Biosynthese der Eikosanoide aus Arachidonsäure [Nilius 2001]

### 3.3 Endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (EDHF):

Das Endothel kontrolliert den Tonus der Gefäße nicht nur mit Autakoiden wie Nitroxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), sondern auch mit Substanzen, die eine Hyperpolarisation der darunterliegenden Muskulatur bewirken. Man entdeckte sie auf Grund der Tatsache, dass nach Antagonisierung der Vasodilatation durch NO oder PGI<sub>2</sub> die Vasodilatation nicht aufgehoben war, daher suchte man die Existenz eines NO/PGI<sub>2</sub> unabhängigen Faktors, der auch Vasodilatation bewirkte und fasste dies anfangs unter dem Begriff „endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor“ (endothelium-derived-hyperpolarizing-factor: EDHF) zusammen. Heute weiß man, dass verschiedene Mechanismen für die Hyperpolarisation erforderlich sind. Im Allgemeinen äußern sich die durch EDHF herbeigeführten Antworten in einem Zuwachs an intrazellulärem Kalzium, dem Öffnen von Kalzium aktivierten Kalium Kanälen geringer und großer Leitfähigkeit und Hyperpolarisation der endothelialen Zellen, die mittels myoendothelialer Verbindungen (Gap-junctions) an die glatten Muskelzellen übertragen wird und dort eine Hyperpolarisation auslöst, in weiterer Folge kommt es zur Ansammlung von Kalium Ionen im Interzellulärraum. Diese

hyperpolarisieren die glatten Muskelzellen durch Konversion der inneren Kaliumkanäle und/oder Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase. ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase). In einigen Blutgefäßen, dazu gehören auch die Koronararterien, werden Arachidonsäure und Metaboliten des Cytochrom P450 Monooxygenase Stoffwechsels freigesetzt. Die gebildeten Epoxyeicosatrien Säuren (EET) sind nicht nur intrazelluläre Messenger, sie können diffundieren und auch eine Hyperpolarisation der glatten Muskulatur durch Aktivierung von kalziumabhängigen Kalium Kanälen bewirken. Zusätzlich kann das Endothel auch Faktoren wie Lipooxygenasenderivate und Wasserstoffperoxid produzieren; diese Vorgänge laufen nicht isoliert ab, sie können auch gleichzeitig aufscheinen [Félétou 2006 und 2009].

**Pathophysiologische Gleichgewichte, die durch das Endothel reguliert werden**

**Antithrombotisch:**

Prostazyklin  
Heparin-Proteoglykane  
Gewebeplasminogenaktivator  
Urokinase  
Plasminogenaktivator-Inhibitor-1

**Vasorelaxantien**

Prostazyklin  
EDHF  
Stickstoffmonoxid (EDRF)

**Antiinflammatorisch**

Stickstoffmonoxyd  
Antioxidative Enzyme (SOD)  
Komplementregulierende Faktoren  
Prostazyklin  
Kinase II

**Prothrombotisch**

Thrombomodulin  
Gewebefaktor  
Plättchenaktivierender Faktor  
Von Willebrand-Faktor  
Andere Koagulationsfaktoren

**Vasokonstriktoren**

Endothelin-1  
PDGF  
Angiotensin II

**Proinflammatorisch**

Zytokine ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ , M-CSF, GM-CSF)  
Chemokine ( $\text{IL-8}$ , MCP-1)  
ELAMs  
  
E-, P-Selektine, ICAM-1, VCAM-1, L-Selektin-Liganden

**Tabelle 4:** Pathophysiologische Gleichgewichte

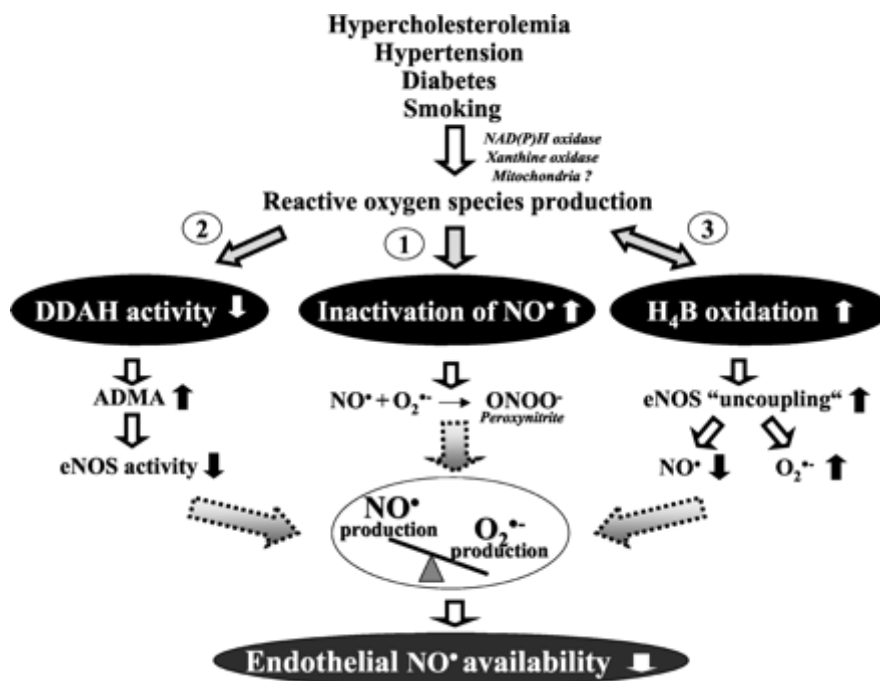
### 3.4 Endotheliale Dysfunktion

#### 3.4.1 Entstehung der endothelialen Dysfunktion - Arteriosklerose

Die endotheliale Dysfunktion ist durch folgende Parameter gekennzeichnet:

- reduzierte Vasodilatation
- proinflammatorischer Zustand
- prothrombotische Eigenschaften

Dies ist mit den meisten Formen der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) verbunden wie Hypertension, koronärer Herzkrankheit (KHK), chronischen Herzfehler, peripherer arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Diabetes und chronischen Nierenfunktionsstörungen. Mechanismen, die zur Verringerung der Vasodilatation beitragen, sind durch verminderte NO Produktion, oxidativen Stress mit Bildung von Sauerstoffradikalen und herabgesetzter Produktion von endothelabhängigem hyperpolarisierenden Faktor bedingt [Endemann 2004].



**Abbildung 11:** Cardiovasculäre Risikofaktoren



Größere cardiovasculäre Risikofaktoren erhöhen die Produktion von Sauerstoffradikalen, welche die Verfügbarkeit von NO auf drei verschiedenen Stoffwechselwegen herabsetzen: 1) direkte Inaktivierung von NO mit Superoxid ( $O_2^-$ ), dadurch kommt es zum Aktivitätsverlust von NO; 2) verminderte NOS Aktivität, die durch erhöhte ADMA Spiegel ausgelöst wird, ADMA ist ein endogener Hemmer der NOS, der aus der redoxsensitiven Hemmung von DDAH (Dimethylarginine dimethylaminohydrolase) resultiert; 3) eNOS Entkoppelung auf Grund erhöhter Oxidation von H4B (Tetrahydrobiopterin); ONOO = Peroxinitrit [Landmesser 2004].

Durch vermehrte Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen kann die endothelschädigende Wirkung von Leukozyten beginnen. An der Oberfläche der Endothelzellen werden unter anderem ICAM-1, P-Selektin und E-Selektin, die die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten steigern, exprimiert. Der Leukozyt beginnt durch die geringere Distanz zum Endothel und die Selektin-Rezeptoren zu rollen, es kommt zu Interaktionen zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel. Die Zellen des Blutstroms, darunter Leukozyten, Thrombozyten, werden nun durch Mediatoren wie den endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor, Interleukin 8, Leukotrien B4 und Bradykinin aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Integrinen an der Leukozytenoberfläche und es wird eine feste Bindung von Leukozyten und Endothelzellen ermöglicht. Es kommt zur Extravasation der Zellen in das perivaskuläre Parenchym, dort werden gewebstoxische Mediatoren produziert, womit das Gewebe zusätzlich geschädigt wird. Die Thrombozyten interagieren mit dem Gefäßendothel, es ändert sich die Distanz zum Endothel, vor allem durch P-Selectin, sie werden aktiviert und lagern sich an. Die Gewebsschädigung wird durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Eikosanoiden, Chemokinen und Wachstumsfaktoren der aktivierten Thrombozyten hervorgerufen. Der Ablauf der Entzündungsreaktionen kann als zentrales Geschehen gesehen werden, durch welches eine Vielzahl von anderen Prozessen zusätzlich durch diverse Mediatoren in Gang gesetzt wird [Waldner 2007, Loscalzo 2003].

### 3.4.2 Bildung der Läsion am Gefäßendothel

Im Rahmen einer gesteigerten Permeabilität der Intima des Endothels kommt es zur Durchlässigkeit für Plasmaproteine, hier vor allem bei den Lipoproteinen, dadurch können sich Low-Density-Lipoproteine an bestimmten Stellen ansammeln und Fettablagerungen (fatty streaks) bilden. Sie verbinden sich mit Komponenten der extrazellulären Matrix wie Proteoglykanen und behindern deren Austritt. Diese Retention sequestriert Lipoproteine in der Intima, es entstehen extrazelluläre Liposomen. Diese LDL Partikel sind von den Antioxidantien des Plasmas getrennt und ihre Oxidation wird begünstigt, die durch adhärente Monozyten und T-Lymphozyten ermöglicht wird. Diese Fremdkörper werden dann von Makrophagen resorbiert und es entstehen Schaumzellen, die eine veränderte biosynthetische Funktion haben; sie bilden Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie Tumor –Nekrose-Faktor und Interleukin(IL)-1 $\beta$ . Somit ist der betroffene Gefäßabschnitt proinflammatorischen Geschehnissen ausgesetzt und die Bildung von weiteren atherosklerotischen Veränderungen ist begünstigt.

Solche Läsionen treten häufig an jenen Stellen auf, wo turbulente Strömungen vorkommen, wie etwa an Verzweigungsstellen von Gefäßen. Bei fortschreitender Atherosklerose kommt es in dem so entstandenen Atherom an der Gefäßwand zu fibrotischen Veränderungen, die zum größten Teil durch verschiedene Enzyme und Wachstumsfaktoren bedingt, aus glatten Muskelzellen gebildet wird. Wenn es auch derzeit noch nicht gelingt, einen gemeinsamen Nenner für die endotheliale Dysfunktion festzulegen, die durch verschiedene pathophysiologische Faktoren wie oxidiertes LDL, Homocystein, Advanced Glycation Endproducts, postprandiale Hyperglykämie, Zytokine, bakterielle Stoffwechselprodukte und hämodynamische Stressfaktoren ausgelöst werden, so stehen der Redoxzustand der Zelle und die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) im Zentrum des Geschehens. Wenn die antioxidativen Mechanismen der Endothelzellen nicht mehr ausreichen, werden eben diese

Zellen stimuliert ROS zu bilden. Zusätzlich können durch Granulozyten, die bei der Phagozytose um ein Vielfaches mehr Sauerstoff brauchen (oxidative burst), weitere ROS dazukommen. Sauerstoffradikale in ausreichender Menge schädigen das Endothel und verändern die Expression von Makromolekülen wie Proteinen und DNA, führen damit zum proinflammatorischen Zustand, wodurch die endotheliale Genexpression verändert wird, da sie redox sensitiv ist. (die Produktion von Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B und AP-1 wird durch freie Sauerstoffradikale reguliert). ROS können auch direkt mit NO reagieren, wodurch die Aktivität von NO absinkt und Peroxynitrit entsteht, welches toxisch ist [Rösen 2002, Packard 2007].

### **3.5 Vaskuläre Verkalkung**

Beim Menschen setzt die vaskuläre Verkalkung durchschnittlich mit über 60 Jahren ein und vermindert die kardiovaskuläre Funktion. Früher betrachtete man diesen Prozess als passiv-degenerativ, heute sieht man darin einen pathologischen Prozeß, ähnlich der Knochenentwicklung im Embryo. Der Durchbruch dieser Annahme entstand durch die Erkenntnis, dass der Metabolismus, wie endotheliale, mesenchymale und hämopoetische Zellen untereinander agieren und auf mechanische, entzündliche, metabolische und morphogenetische Auslöser reagieren, den Signalen, die die Mineralisation des Skelets beim Knochenwachstum beherrschen, gleicht. Die artherosklerotische Verkalkung ist die üblichste Form der Vaskulopathie, die durch Induktion osteogenetischer Differenzierung in einem Teil der Gefäßzellen durch Entzündungsfaktoren wie modifizierte Lipoproteine und Zytokine, die atheromatöse Bestandteile der Plaques sind, entstehen. Es besteht teilweise die Meinung, dass Dyslipidämie mit der Präsenz, dem Schweregrad, dem Fortschritt der vaskulären Kalzifizierung, vor allem, wenn dies mit Exposition zu erhöhtem Cholesterin über längere Zeit besteht, in Zusammenhang gebracht werden kann [Demer 2008].

---

Die Erkenntnisse, die bis dato gewonnen worden sind, geben Anlass anzunehmen, dass es die Technologien auf dem Gebiet der Genomik, Proteomik und Metabolomik zusammen mit den Fachgebieten Bioinformatik, mathematischen Modellen komplexer Systeme, der Nonlinear Dynamics Software für Proteomik, dem Forscher ermöglichen wird, das Modell des Gefäßsystems darstellen zu können, welches den kompletten Phänotyp beschreibt. Diese neu gewonnenen Techniken geben den Wissenschaftlern die Möglichkeit, sowohl im steady state als auch bei Änderungen der exprimierten Gene, gefäßtypischen Proteine und der metabolischen Zwischenprodukte, eine Antwort zu Änderungen in der Umgebung oder zu genetische Störeinflüsse zu erkennen [Loscalzo 2003].

## **4 BIOMARKER (BM)**

### **4.1 Definition**

Biomarker ist ein Charakteristikum, das objektiv gemessen wird und das als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Antworten auf therapeutische Interventionen gewertet wird. Im Rahmen der Ernährung kennzeichnen sie die Aufnahme einer bestimmten bioaktiven Substanz oder eine Exposition zu dieser [Davis 2007].

Sie können aus biologischen Proben wie Blut, Urin oder Gewebe entnommen werden, es kann eine Meßgröße wie Blutdruck oder Elektrokardiogramm sein oder aber ein bildgebendes Verfahren wie z.B. Computertomographie.

BM können ein Indikator für die Charakteristik einer Erkrankung sein, ein Kennzeichen für den Status (ob präklinisch oder bereits manifest) oder aber für die Progression einer Erkrankung. Daher gibt es antecedente BM, die das Risiko der Entwicklung einer Erkrankung zeigen, Biomarker für Screeningmethoden, die subklinische Erkrankungen aufdecken, weiters solche, die in der Diagnostik eingesetzt werden; hier wird eine bereits bestehende Erkrankung festgestellt und letztendlich verwendet man BM, die das Stadium einer Krankheit bestimmen. Unter den prognostischen BM fasst man jene zusammen, die den zukünftigen Verlauf einer Erkrankung aufzeigen, sowohl Rückgang als auch die Antwort einer Krankheit auf Therapie, hier wird die Effizienz einer Behandlung gemessen [Ramachandran 2006].

### **4.2 Entdeckung von Biomarkern**

Drei parallele Entwicklungen haben das Gebiet der Entdeckung von BM wesentlich beeinflusst:

- 1) Die Fertigstellung des Human Genom Projekts
- 2) Das HapMap Projekt

- 3) Die Entwicklung von Mikroarrays, Proteomik und Nanotechnologie sowie hoch funktionelle, hoch sensitive Assays.

Diese drei Faktoren bieten neue Wege zur Entdeckung von BM für CVD und auch für das Wechselspiel zwischen Ernährung-Erkrankung und Phänotyp. Nicht nur die Bioinformatik, sondern auch die Zusammenarbeit von Experten der jeweiligen Wissensgebiete hat maßgeblich dazu beigetragen, die großen Datenmengen zusammenzutragen, zu charakterisieren und zu analysieren.

Krankheiten entstehen als dynamische Fehlregulation in einem Netzwerk, an dem verschiedenen Gene, Proteine und metabolische Veränderungen beteiligt sind, sie reflektieren eine komplexe Störung des Systems. Man kann daher nicht annehmen, dass ein einzelner BM den veränderten Zustand ausreichend klären könnte. Es wird eine Analyse multipler Parameter benötigt, die hunderte von Molekülen identifizieren können, damit man eine bessere Diagnose stellen und eine gezielte Therapie ansetzen kann [Ramachandran 2006].

### **4.3 Entwicklung von BM für CVD**

Bei der Entwicklung von BM für CVD gibt es zwei Methoden, welche sich nicht ausschließen sondern im Ergebnis addieren:

Die erste basiert auf bestehendem Wissen und wird die deduktive Methode genannt. Da man die biologischen Vorgänge kennt, die bei Atherosklerose und den Folgeerkrankungen auftreten, werden BM nach den entsprechenden Abläufen festgelegt, ihre Detektion verbessert und weitere Assays mit neuen Kandidatenmarkern entwickelt.

Die zweite Methode wird die induktive Strategie genannt und besteht darin, dass man mit Hilfe von neuen Technologien tausende von Molekülen findet und aufzeichnet, die in einem bestimmten Stadium der Erkrankung festzustellen sind.

Werkzeuge der Systembiologie, die für die Entdeckung von BM herangezogen werden, sind:

- das Gen selbst
- die mRNA, die es produziert,
- das Protein, das durch die mRNA kodiert wird und
- molekulare Netzwerke [Marko-Varga 2005].

Technologie	Methode	Ziel	Gewebe
Genomics	SNP Genotypisierung	Identifikation von Genen, die durch Prädisposition oder Krankheit verändert werden	Erkranktes Gewebe, zellkernhaltige Zellen
	Positionsklonierung, Mikrosatelliten	Feinkartierung/Sequenzierung von erkrankten Loci	
	Expressionsanalyse	Identifikation von unterschiedlichen Genexpressionen und Signalwegen	
Proteomics	2DGE, MS, LC-MS, MS-MS, MALDI-TOF MS -	Identifikation von niedrig abundanten Proteinen, ihre subzelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifikation, Interaktionen unter Proteinen	Urin, Blut, Speichel, Gewebe
Metabolomics	NMR Spektroskopie, MS, Infrarot Spektroskopie	Identifikation und Charakterisierung kleiner Moleküle	Wie oben

**Tabelle 5:** modifiziert nach Ilyn 2004

GC-MS: Gas Chromatographie-Massenspektrometrie,

LC-MS: Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie,

MALDI-TOF: Matrix assistierte Laser Desorptions /Ionisation –Time Of Flight Massenspektrometrie,

MS: Massenspektrometrie,

MS-MS: Tandem Massenspektrometrie,

NMR: Nuclear Magnetic Resonanz Spektroskopie

#### 4.4 Genetische Studien in Bezug auf BM:

SNPs sind auf dem Gebiet der Forschung nach BM bei CVD besonders genau untersucht worden. Um die Verbindung von genetischen Sequenzvariationen zu

CVD herzustellen, gibt es zwei komplementäre Wege: der eine Ansatz führt über Kopplungsstudien, der andere über Assoziationsstudien [Ramachandran 2006].

Bei Kopplungsstudien werden Familien - mindestens drei Generationen -, welche die entsprechende Krankheitsgeschichte haben, auf eine gemeinsame Vererbung von chromosomalen Abschnitten untersucht. Als Marker nimmt man Sets von Mikrosatelliten, die über das Genom verteilt vorliegen. Man scannt sozusagen das Genom und untersucht Abschnitte, die sich durch die Erkrankung abheben mittels „fine mapping“ noch intensiver. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Kandidatengene zu finden. Am Anfang steht das Wissen um den Mechanismus einer Erkrankung und mögliche Vererbung desselben und in Folge darauf findet man Gen Loci, die vorher nicht mit der Erkrankung in Verbindung gebracht worden sind [Mündlein 2008].

Bei Assoziationsstudien werden Daten einer Patientenstichprobe mit denen einer Kontrollgruppe gesunder Personen untersucht, um dadurch ein mit der Krankheit verknüpft genetisches Merkmal zu identifizieren.

Bei den Kopplungsstudien hat man in Bezug auf die komplexen Eigenschaften bei CVD nur bescheidene Ergebnisse, für monogenetische Erkrankungen sind sie sehr hilfreich.

Die wissenschaftliche Überlegung bei den Assoziationsstudien liegt darin, dass allgemeine genetische Varianten mit moderaten Effekten zur Variation bei komplexen Erkrankungen in der Bevölkerung beitragen. Die Erkenntnis, dass Gruppen benachbarter Polymorphismen sehr stark in Beziehung stehen, hat zum Konzept von Tag SNPs geführt. Diese Tag SNPs können als Stellvertreter für die meisten gewöhnlichen genetischen Varianten in einer Region mit Kopplungsungleichgewicht verwendet werden. Die Identifikation von Tag SNPs führt bei Assoziationsstudien zu einer großen Erleichterung, weil weniger Marker genotypisiert werden müssen.



Letztlich haben beide Studienarten wertvolle Erkenntnisse für genetische Marker, die eine Rolle in der Pathogenese der CVD spielen, gebracht. So konnten Gene für CVD identifiziert werden, wie zum Beispiel Zytokin-Lymphotoxin (LTA, on 6p21.3 für Myokardinfarkt), Galectin-2 (LGALS2, ein LTA interagierendes Protein auf 22q12-q13 für Myokardinfarkt), 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein, welches in die Synthese proinflammatorischer Leukotriene involviert ist (ALOX5AP auf 13q12-q13 für Myokardinfarkt und Schlaganfall) und einige andere mehr [Marko Varga 2005].

#### 4.5 Technische Überlegungen bei BM

Die Bestimmung des Plasma Lipid Profils ist unerlässlich, um das atherosklerotische Risiko festzustellen, allerdings gibt dieses Profil ein inkomplettes Bild: häufig erkrankten Patienten an akuten CVD, die der heutigen Auffassung entsprechend, normale Cholesterin- und LDL-Werte aufweisen oder sogar darunter liegen. Daher wurden inflammatorische Biomarker zur Risikobeurteilung bei CVD herangezogen. Auf Grund der relativ neuen Erkenntnis, dass die zentrale Rolle bei der Atherogenese durch Entzündung bedingt ist, erhebt sich die Frage, ob Entzündungsmarker, unabhängig von Cholesterol und Markern für Hypertonie, die verschiedenen Aspekte der pathogenetischen Mechanismen dieser Erkrankung aufzeigen. BM für Entzündung beinhalten VCAM-1, Zytokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukin-1 und Interleukin-18, Proteasen, das Messenger Zytokin IL-6, Produkte aktivierter Thrombozyten wie CD40L<sup>18</sup>, MRP8/14 (Calprotectin, Myeloid Related Protein), Adipokine wie Adiponektin und Akutphasenproteine wie C-reaktives Protein (CRP), PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor) und Fibrinogen. Ideal wäre ein BM, der unabhängige Information des kardiovaskulären Risikos gibt, der leicht zu messen ist, kostengünstig und standardisierte kommerzielle Assays mit geringer Variabilität hat und keine

---

<sup>18</sup> Protein, das zur Superfamilie der TNF gehört

aufwändige Sammlung des Blutplasmas braucht. Diesen Anforderungen entspricht am besten das CRP, weiters ist es unabhängig vom Tag-Nacht-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme, es hat eine lange Halbwertszeit und einen bemerkenswerten dynamischen Bereich [Packard 2008].

#### 4.6 C - reaktives Protein

CRP ist ein Marker für Entzündungen und wird gemäß der derzeitigen Meinung als Marker für eine bevorstehende Gefährdung bei gesunden Personen als auch zur Risikostratifizierung bei kranken Patienten herangezogen. Ein Anstieg im Plasma erfolgt auf Grund der Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-6. Zu den biologischen Funktionen des CRP's gehören die Bindung von endogenen und exogenen Substanzen und Opsonierung. Ein über den Normalwert erhöhter Spiegel, weist auf eine Entzündung im Körper hin. Es gibt zwei Methoden CRP Spiegel zu messen:

Die Standard Messung, welche im klinischen Alltag als Parameter für Entzündungen aller Art angewendet wird und zum Routineprogramm gehört; die CRP Messung schlechthin, sowie die hoch sensitive Messung für CRP (hs CRP), die den niedrigen Bereich der CRP Spiegel genau bestimmt und als Marker für CVD diskutiert wird<sup>19</sup>. In der Folge wird hier nur von hs CRP gesprochen. Es empfiehlt sich, hs CRP Werte im Rahmen von Verlaufskontrollen zu bestimmen und zu beurteilen. Es gibt Studien, die festgestellt haben, dass ein langsamer Abfall nach erhöhtem CRP Spiegel für eine Gefährdung der Herz-Kreislaufsystems steht, ein rascher Abfall hingegen eine gute Prognose anzeigt [Jaffe 2007].

Als Marker für Atherosklerose kann CRP herangezogen werden, da an den atheromatösen Plaques entzündungsfördernde Moleküle exprimiert werden, die den CRP Spiegel erhöhen, vor allem bei der Ruptur eines Plaques. CRP als

---

<sup>19</sup>Name: High-sensitivity C-reactive protein, wird zu den Cardiac Risk Assessment Tests gezählt [http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/hscrp/test.html (13.03.2010)]

Mediator heranzuziehen ist nach dem heutigen Wissensstand noch nicht mit Sicherheit belegt. Experimentelle Ergebnisse zeigen einen direkten proinflammatorischen Effekt auf Endothelzellen, auch die Aufnahme von LDL durch Makrophagen wird durch CRP vermittelt. Studien an Menschen und Tieren lassen vermuten, dass CRP Prozesse einleitet, die in die Pathogenese der arteriellen Thrombose eingreifen, z.B. durch Dysregulierung der Fibrinolyse. CRP wird nicht nur in der Leber gebildet sondern auch in anderen Geweben wie SMC<sup>20</sup> von normalen Koronararterien als auch koronaren Endothelzellen [Packard 2008].

Die Frage, ob CRP auch geeignet ist, akute koronare Erkrankungen anzuzeigen, wird in zahlreichen groß angelegten Studien untersucht. Eine häufig zitierte Arbeit ist jene der University of Cambridge, United Kingdom, die 2004 im „New England Journal of Medicine“ erschienen ist. Es wurde 2.459 Patienten und 3.969 Kontrollpersonen untersucht, die aus der prospektiven Reykjavik Studie mit 18.569 Teilnehmern stammten und bis zum Ende dieser Studie keinen MI gehabt hatten. (Man führte also eine eingebettete Fall-Kontroll-Studie innerhalb einer prospektiven Kohortenstudie durch, die etwa 19.000 Männer und Frauen mittleren Alters ohne bekannten MI beinhaltete). Um den prädiktiven Wert der CRP Konzentrationen zu vergleichen, wurden andere inflammatorische Marker, die sich bei koronaren Herzerkrankungen verändern, herangezogen; Blutsenkungsgeschwindigkeit und der von Willebrand Faktor.

Die Assoziation zwischen CRP Spiegel und KHK variierte nicht signifikant in Anlehnung an etablierten Risikofaktoren wie Rauchen, erhöhte Blutfettwerte, Blutdruck und BMI, die hs CRP Messungen ergaben auch keine besseren Ergebnisse als die herkömmlichen allgemein anerkannten Risikofaktoren wie Blutsenkungsgeschwindigkeit und von Willebrandfaktor.

Zusätzlich wurde eine aktualisierte Metaanalyse durchgeführt, um die Relevanz der Arbeit festzustellen. Es wurden 22 Studien über CRP herangezogen, man

---

<sup>20</sup> Smooth muscle cell (Zelle der glatten Muskulatur)

hatte dadurch die Daten von 7.068 Patienten mit einem mittleren Alter von 57 Jahren und einer Zeitspanne von 12 Jahren, über die die Daten gesammelt worden waren. Diese Metaanalyse bestätigte die erhobenen Studienergebnisse für hs CRP, Blutsenkungsgeschwindigkeit und von Willebrandt Faktor: diese sind in ihrer Wertigkeit ähnlich einzustufen wie Gesamtcholesterin und Blutdruck [Danesch 2004].

Ob Änderungen der CRP Spiegel auf Grund von Polymorphismen in CRP Gen Loci auftreten und dies eine bessere Aussage in Hinblick auf koronare Erkrankungen gäbe, wurde in verschiedenen Studien untersucht. Bei jener von Elliot 2009 wurde eine genomweite Assoziations- und Replikationsstudie<sup>21</sup> durchgeführt, um genetische Loci zu identifizieren, die sich mit verschiedenen Plasmakonzentrationen an CRP verbinden lassen. Es wurde auch eine Mendelsche Randomisierungstudie durchgeführt. Eine Mendelsche Randomisierungsstudie basiert auf dem 2. Mendelschen Vererbungssatz, welcher besagt, dass die Vererbung eines Merkmals unabhängig von der Vererbung anderer Merkmale ist. Man kennt genetische Varianten, die an der Ausbildung von Risikofaktoren für eine Erkrankung beteiligt sind.

Im Fall von CRP liegt ein kausaler Faktor vor, der genetische Polymorphismus ist mit dem entsprechenden Endpunkt verknüpft. Somit können andere Faktoren, die mit der Erkrankung zusammen hängen, ausgeschaltet werden. Die Population der Studie wird in 2 Gruppen geteilt, eine mit dem spezifischen Merkmal und eine, die dieses nicht hat, die anderen Einflussvariablen sind gleich verteilt [Elliott 2009, Schmitz 2008].

Die Annahme, dass der Polymorphismus an fünf verschiedenen Gen Loci mit den CRP Blutspiegel assoziiert werden kann, wurde bestätigt, die CRP Spiegel waren alle niedriger. Die Assoziation von SNP rs7553007 am CRP Locus, der mit KHK in Verbindung steht, wies sogar etwa 20% niedrigere CRP Werte auf. Die Mendelsche Randomisierungsstudie (28.000 Fälle im Vergleich zu 100.000

---

<sup>21</sup> Wiederholungsuntersuchung zur Überprüfung der Ergebnisse vorheriger Studien

Kontrollen) zeigte keine Assoziation zwischen den Variationen am CRP Locus und KHK, was gegen eine kausale Rolle von CRP bei der Artherosklerose und KHK spricht [Elliott 2009].

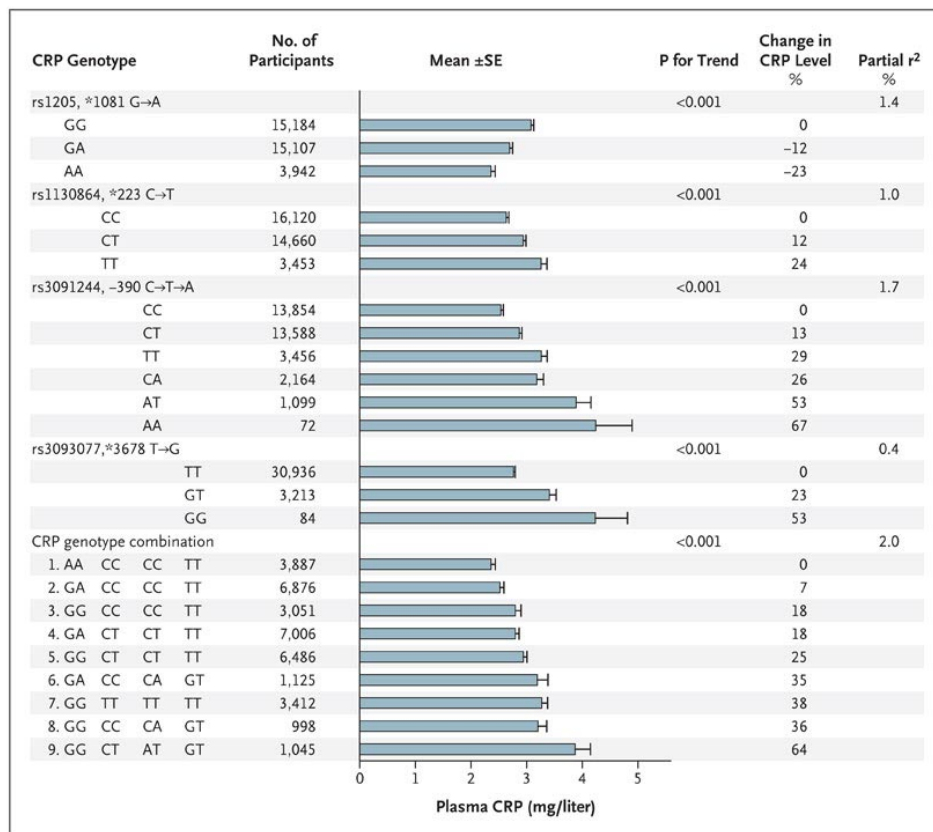
Es wäre anzumerken, dass der Autor keine Angabe darüber gibt, ob die untersuchten Personen aus einem Kollektiv stammen, bei dem geklärt wurde, ob eine Statineinnahme vorliegt oder nicht. Wie aus der Jupiterstudie [Ridger 2008] hervorgeht, ist die Einnahme von Statinen unter bestimmten Voraussetzungen mit einer Erniedrigung der CRP Spiegel verbunden, der mit der Senkung des LDL Spiegels einhergeht.

In der Studie von Zacho wurden Polymorphismen der Genloci für CRP zusätzlich zwei Loci am Apolipoprotein E Gen und ihre jeweilige Kombination untersucht. Auch hier war die Frage zu klären, ob erhöhte CRP Spiegel kausal mit ischämischen Erkrankungen der CVD zusammen hängen. Es waren andere CRP Loci als jene, die Elliott untersuchte, keiner der Polymorphismen war in der Kodierungsregion des CRP Gens gelegen, drei der vier Polymorphismen beeinflussten die Bindung des Transkriptionsfaktors und die Transkriptionsaktivität, zwei weitere Polymorphismen lagen am Apolipoprotein E Gen. Das Risiko war bei Personen mit stärker erhöhtem CRP Spiegel im Vergleich zu solchen mit niedrigerem sichtbar. Wenn man die Genotyp Kombinationen betrachtete, konnte man kein erhöhtes Risiko für ischämische CVD feststellen. Die höheren Plasmaspiegel an CRP sind auch hier als Marker und nicht als kausaler Faktor zu sehen. [Zacho 2008].

#### **4.7 Fibrinogen**

Grob gesprochen wird Fibrinogen als Marker für die Blutgerinnung einerseits und als Akutphasenprotein andererseits eingesetzt, das Entzündungen anzeigt. Chronisch erhöhte Spiegel an Fibrinogen zeigen das Risiko für Thrombosen und CVD an [Hallbach 2006].

In einer genomweiten Assoziationsstudie (sie wurde zum Zweck der Entdeckung neuer genetischer Loci für Fibrinogen durchgeführt), die auf 6 populationsbasierenden Studien aufbaute und 22.096 Teilnehmer mit europäischen Vorfahren hatte, wurden vier Loci festgestellt, die einen oder mehrere SNPs aufzeigten, die genomweite Signifikanz hatten. Es wurden insgesamt 73 SNPs gefunden, was die Schwelle für eine genomweite Assoziationsstudie an Signifikanz übersteigt, diese waren an vier Stellen gehäuft und zwar Chromosom1 (2 SNPs), 3 (12 SNPs), 4 (23 SNPs) und 5 (36 SNPs). Die beste statistische Assoziation wurde für rs1800789 gefunden, das im Gen für die Fibrinogen  $\beta$  Kette lokalisiert ist, 4q31.3 in Exon 7.



**Tabelle 6:** Plasmaspiegel des CRP  
als Funktion von CRP Genotyp und Genotyp Kombination in der normalen Bevölkerung [Zacho J et al. N Engl J Med 2008; 359:1897-1908]

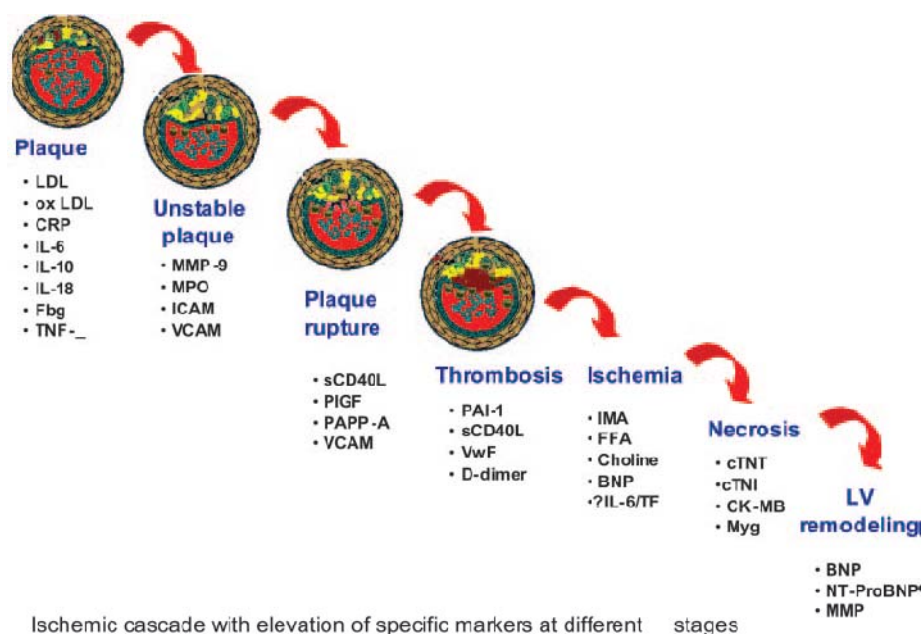
An dieser Abbildung sieht man, dass die Variation der CRP Genotypen nur 2 % der Variationen der CRP Spiegel in der Population dieser Studie erklären.

Assoziationsstudie an Signifikanz übersteigt, diese waren an vier Stellen gehäuft und zwar Chromosom1 (2 SNPs), 3 (12 SNPs), 4 (23 SNPs) und 5 (36 SNPs). Die beste statistische Assoziation wurde für rs1800789 gefunden, das im Gen für die Fibrinogen  $\beta$  Kette lokalisiert ist, 4q31.3 in Exon 7.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde eine Replikationsstudie in der Women's Health Genome Studie durchgeführt.

Ein kombinierter Risiko-Allel-Score, der die Zahl der Risiko-Allele zusammenfasste, wurde mit einem 15% Anstieg des Fibrinogenspiegels in Zusammenhang gebracht, wenn man ihn mit Teilnehmern ohne ein einziges Risiko-Allel verglich. Allerdings erklärte die in dieser Studie gefundene genetische Varianz insgesamt nur 2% der gesamten Varianz bei fünf der sechs Studien, bezogen auf die Plasma Fibrinogen Spiegel [Deghan 2009].

Mit welcher Fülle an Biomarkern in einzelnen Stadien des akuten Koronarsyndroms theoretisch zu rechnen ist, wird in der nachfolgenden Abbildung deutlich:



**Abbildung 12:** Biomarker des akuten Koronarsyndroms

Die Pfeile zeigen die Folge der Ereignisse. Biomarker, welche in der jeweiligen Phase erhöht sein könnten, sind unter dem jeweiligen Bild angegeben. sCD40L:

löslicher CD40 Ligand<sup>22</sup> Fbg: Fibrinogen; FFA: freie Fettsäuren; ICAM, interzelluläres Adhäsionsmolekül; IL: Interleukin; IMA: ischemia modified albumin (durch Ischämie modifiziertes Albumin), MMP: Matrix Metalloproteinase; MPO: Myeloperoxidase; Myg: Myoglobin; NT-proBNP: aminoterminaler proBNP (NT-proBNP), (BNP: Brain Natriuretic Peptide); Ox-LDL, oxidiertes low-density Lipoprotein; PAI-1: Plasminogen Aktivator Inhibitor; PAPP-A: Pregnancy-associated Plasma Protein-A; PlGF: plazentaler Wachstumsfaktor; TF: tissue factor; TNF, Tumor Nekrose Factor; TNI: Troponin I; TNT: Troponin T; VCAM: vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül; und VWF: von Willebrand Factor [Ramachandran 2006].

#### **4.8 Lp-PLA2 : Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2**

Lp-PLA2 ist eine Kalzium unabhängige Lipase, die von Makrophagen an der Gefäßwand von Arterien produziert wird, an LDL gebunden zirkuliert und spezifisch für Entzündungen an der Arterienwand gilt [ Jaffe 2007, Bale 2009]. Der Vorteil gegenüber hs-CRP liegt darin, dass der Blutspiegel von LP-PLA2 weder durch systemische Infektionen noch durch Arthritis angehoben wird und keine so starke interindividuelle Variabilität, wie sie bei CRP vorliegt, vorkommt [Bale 2009].

Es zeichnete sich in bereits durchgeführte Studien ab- z.B. der MONICA Studie-Augsburg Erhebung [Koenig 2004], dass LpPLA2 als proinflammatorisches Molekül und unabhängiger Risikofaktor für KHK gesehen werden kann. LpPLA2 katalysiert die Hydrolyse von oxidierten Phospholipiden und generiert so oxidierte freie Fettsäuren sowie Lysophosphatidylcholin; beide sind potente proatherogene und proinflammatorische Produkte [Kim 2008]. Patienten mit höherem LP-PLA2 Spiegel haben eine höhere Anfälligkeit für CVD und Schlaganfall, dieser Marker zeigt auch unabhängig von den Blutfettwerten ein erhöhtes Risiko für vaskuläre und KHK an [Khakpour 2009].

#### **4.9 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)**

MCP-1, spielt eine bedeutende Rolle bei der zellulären Immunreaktion, indem es an der Bereitstellung von Mono- und Lymphozyten beteiligt ist. Es ist auf dem

---

<sup>22</sup> Dieser wird von Thrombozyten bei Aggregation freigesetzt.



Chromosom 17q11.2 lokalisiert, der alternative Name ist CCL2 [CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2)] [Joven 2008].

MCP-1 wird auch in zahlreichen Studien im Bereich Ernährung und CVD als Biomarker verwendet, z.B. Studien über Fettstoffwechsel, Polyphenole, Vitamin E und andere.

Dieses Chemokin, das an den atherosklerotischen Veränderungen am Endothel vorkommt und sein Rezeptor CCR2, [chemokine (C-C motif) receptor 2] der auf der Leukozytenoberfläche sitzt, sind an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt. Das konnte in zahlreichen Tierversuchen mit Mäusen nachgewiesen werden. Waren die Rezeptoren an den Leukozytenoberflächen vermehrt, dann wurde die atherosklerotische Plaquebildung verstärkt. Umgekehrt, wenn MCP1 Spiegel oder der Chemokin Rezeptor reduziert wurden, bildeten sich die Plaques zurück [Aiello 1999].

In der Population der Nachkommen der Framingham Herz Studie (Männer: Frauen= 50:50), das Durchschnittsalter war 62 Jahre, wurde die Verbindung von genetischen Variationen des MCP-1 Gens und myokardialen Infarkt untersucht. MCP-1 Spiegel und CCL2 Genotypen wurden bei mehreren Tausend Probanden geprüft. MCP-1 Spiegel korrelierten signifikant mit Alter, Zigarettenkonsum, Triglyceriden, BMI und Bauch-Hüftumfang. Das MCP-1-2578G Allel, das in der regulatorischen Region des CCL2 Gens liegt, konnte mit höheren MCP-1 Spiegeln und einer höheren Prävalenz für Myokardinfarkt (MI) in Zusammenhang gebracht werden. Nachdem die Struktur des Kopplungsungleichgewichts am CCL2 Locus bestimmt worden war, wurden sechs verschiedene Haplotypen bei der weißen Bevölkerung festgestellt. Der Haplotyp, der am häufigsten anzutreffen war, (MCP-1-2578G Allel) ging mit MI einher. Mit dieser Studie konnte nun auch beim Menschen festgestellt werden, dass MCP-1 mit der Pathogenese der menschlichen Atherosklerose und dem MI verbunden ist [McDermott 2005].

#### 4.10 BM in der Ernährungsepidemiologie

Ernährung, Lebensstil und Genetik sind interaktiv betrachtet ein Risiko für chronische Erkrankungen. Wenn man die multifaktorielle Komplexität der Ernährung betrachtet, sind alle Methoden, die die Nahrungsaufnahme und ihren Effekt prüfen wollen, mit Fehlern behaftet.

Dadurch wird mancher Hinweis, den ein Nahrungsbestandteil oder eine Kombination von Nahrungsmitteln auf eine gewisse Erkrankung haben kann, verschleiert. Aus diesem Grund geht man in zunehmendem Ausmaß dazu über, vermehrt ernährungsspezifische BM, die aus biologischen Proben gewonnen werden, einzusetzen und diese in Ergänzung zur Nahrungsaufnahme und dem Ernährungszustand zu bestimmen, sie dienen aber auch als prognostische Hinweise auf chronische Erkrankungen.

Man sieht einen großen Vorteil in der Tatsache, dass BM objektiv gemessen werden und unabhängig von Zweifel und Fehlern sind, die im Gegensatz dazu bei Studienteilnehmern und Diätvorschriften automatisch auftreten.

Auch genetische Variationen beeinflussen die Nahrungsaufnahme und vor allem den Metabolismus der Ernährung, dadurch ist eine weitere Fehlerquelle bei der Bestimmung von Biomarkern in Bezug auf die Auswirkung der Ernährung vorhanden.

Ein „idealer“ Biomarker würde genau nach der Art und Menge der Nahrungsaufnahme messbar sein, er wäre spezifisch, sensitiv und für viele Populationen anwendbar. Die vorhandenen BM sind nicht „ideal“, jene, die heute in Verwendung sind, weisen Funktionalität auf und sind in der modernen Ernährungsepidemiologie weit verbreitet und anwendbar [Jenab 2009, Bingham 2002].

<b>Genetische Variationen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gene, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen wie Geschmack, Attraktion, die gewisse Nahrungsmittel ausüben etc.</li> <li>• Biologische Variationen bei der Absorption von Nahrungsmitteln, dem Metabolismus, dem Stoffwechsel, Ausscheidung</li> </ul>
<b>Epigenetische Variationen, Gen-Gen Interaktionen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lebensstil, physiologische Faktoren</li> <li>• Rauchen, Konsum von Alkohol, Bewegung, Geschlecht, Alter, BMI, sozioökonomischer Status</li> <li>• Einfluss der Mikroflora des Colons (Biokonversion, Absonderung bioaktiver Nahrungskomponenten)</li> <li>• Enterohepatische Zirkulation von Nahrungsbestandteilen (Phytoöstrogene, Lignane)</li> <li>• Metabolische und inflammatorische Störungen, Stress, okkulte/ zugrunde liegende Erkrankungen</li> </ul>
<b>Diätetische Faktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auswahl oder Häufigkeit der Aufnahme eines speziellen Lebensmittels</li> <li>• Nährstoffinteraktionen untereinander</li> <li>• Bioverfügbarkeit des Nährstoffes, Einfluss der Nährstoffmatrix</li> </ul>
<b>Biologische Proben</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Art der Probe ( Vollblut, Plasma, Serum, Urin)</li> <li>• Zustand der Probensammlung, Transport, Behandlung, Lagerung und ihre Dauer</li> <li>• Beeinflussung durch diurnalem Wechsel im Körper, oder Abhängigkeit vom Wochentag oder von der Jahreszeit</li> </ul>

**Analytische Methoden**

- Präzision, Genauigkeit, Limit der Detektion abhängig von der analytischen Technik
- Variationen unter den Methoden oder zwischen verschiedenen Labors

**Tabelle 7** Faktoren, welche die Messung und Brauchbarkeit von BM zur Bestimmung von ernährungsspezifischen Auswirkungen im Körper beeinträchtigen können [Jenab 2009]

## **4.11 Es gibt verschiedene Gruppen an BM**

### **4.11.1 Recovery BM**

diese stellen die metabolische Balance zwischen Aufnahme und Ausscheidung über eine gewisse Zeitspanne dar und erlauben so die Schätzung von absoluten Aufnahmespiegeln, die Ausscheidung korreliert mit der Aufnahme. Bevor sie jedoch zum Zweck einer Validierung eines Fragebogens herangezogen werden, müssen sie in Kalibrationsstudien unter kontrollierten Bedingungen getestet werden. Zu diesen Biomarkern zählt man double labeled water (Isotopenmethode)- und Harnstickstoff Bestimmungen sowie Bestimmung von Kalium im Harn. Der Nachteil dieser Biomarker ist, dass sie sehr kostspielig und aufwändig sind, daher sind sie für große epidemiologische Studien unbrauchbar.

### **4.11.2 Prediktive BM**

Diese werden verwendet, um den Grad des Messfehlers bei der Bewertung der Nahrungsaufnahme festzustellen. Wie die Recovery BM, sind die prediktiven BM sensitiv, zeitbezogen und zeigen ein Dosis/Antwort bezogenes Verhältnis auf die Aufnahme. Der Unterschied ist, dass die gesamte Wiedergewinnung des Ausgangsmaterials niedriger ist.

Als Beispiel wäre hier die Bestimmung der Sucrose und Fructose im 24 Stunden Harn zu erwähnen, welche stark mit der Aufnahme von Zuckern korreliert, obwohl die Menge, die im Harn gemessen wird, äußerst gering ist.

#### 4.11.3 Konzentrations BM

Dazu gehören z.B. die Serumspiegel von Vitaminen, Blutfetten sowie die Elektrolyte im Harn. Auch hier ist ein Vergleich von Bestimmung der Höhe der Spiegel zu einer geschätzten Aufnahme über die Nahrung möglich.

#### 4.11.4 Replacement BM

Diese sind den BM, die für Konzentration verwendet werden, ähnlich. Sie beziehen sich vornehmlich auf Komponenten, für die Informationen in einer Nahrungskompositions-Datenbank unbefriedigend oder nicht vorhanden sind, z.B. Aflatoxine, Phytoöstrogene, Salz oder metabolische Faktoren.

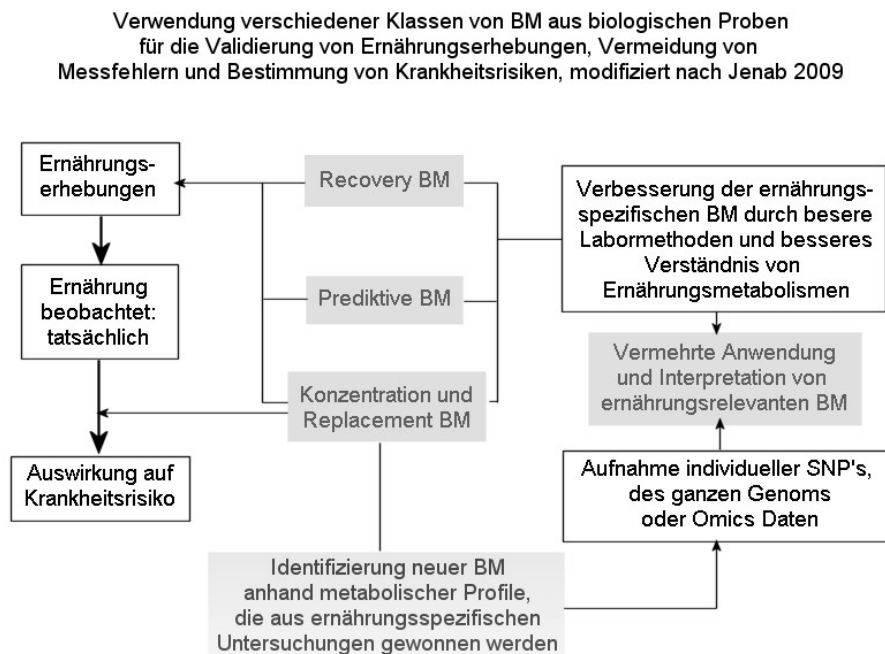


Abbildung 13: Klassen von BM

#### 4.12 Verwendung

Eine gängige Anwendung von Konzentrations- und Replacement BM ist ihre Verwendung bei der Abschätzung von Ernährung und dem Risiko einer Erkrankung. Diese werden bei prospektiven Kohortenstudien vermehrt angewendet, wo biologische Proben vor Krankheitsbeginn an gesammelt werden, oder bei Interventionsstudien in kontrollierten klinischen Versuchen, wo man den Effekt von bestimmten Nahrungssubstanzen auf die Auswirkung einer Krankheit untersuchen möchte. Tatsächlich zeigen die BM Spiegel im Blut oder anderen biologischen Proben den Einfluss von Mikrobiotika auf Biokonversion, Abgabe von ernährungsspezifischen Komponenten oder die enterohepatische Zirkulation an. Man sieht an den Spiegeln, dass Interaktionen zwischen Nahrungsbestandteilen, dem Stoffwechsel, dem Metabolismus und der Ausscheidung stattfinden [Jenab 2009].

Durch die in Tabelle 7 angegeben Faktoren, die den Spiegel von Biomarkern verändern können, ist klar ersichtlich, dass mit dem derzeitigem Angebot an Markern, dem Stand der Biotechnologie und der Computersoftware, die zum Ausarbeiten von einer enormen Anzahl von Werten gebraucht werden wird, derzeit noch keine eindeutig klaren Aussagen bezüglich Schaden oder Nutzen spezieller Nahrungskomponenten auf die Entstehung oder Entwicklung von Krankheiten gemacht werden kann.

Das oberste Ziel in der Ernährungswissenschaft ist, die Gesundheit zu optimieren und Krankheiten zu vermeiden. Um die Physiologie eines gesunden Individuums zu definieren, wäre Folgendes zu beachten:

- a) Man muss BM einsetzen, die bei der Antwort auf eine Störung des Gleichgewichts sichtbar sind, dies ist informativer als die Messung der Homöostase selbst
- b) Prozesse, die das Gleichgewicht erhalten, sind multifaktoriell und daher sind quantitative Analysen erforderlich

- c) Gesundheit beinhaltet eine große Variabilität und die Effekte, die durch ernährungsspezifische Interventionen bewirkt werden, sind oft versteckt, wenn man keine umfassenden Untersuchungen anstellt.

Um dies zu klären, setzt man die umfangreichen „Omics“ Analysen ein, um Schlüssel Parameter identifizieren zu können und diese als BM weiter zu verwenden [Ommen 2009].

Im Zusammenhang mit “CVD-Diabetes führt vermehrt zu Atherosklerose” wäre eine Studie der Harvard Universität in Boston zu erwähnen, die sich mit dem metabolischen Profil nach Glucosebelastung auseinander gesetzt hat. Sie untersuchten Glukose Aufnahme nach einer nächtlichen Fastenperiode, ein Vorgang, der bei Menschen mit Diabetes im Gegensatz zu Menschen mit normalem Glucosestoffwechsel in der Homöostase gestört ist. Für die Untersuchungen wurde ein System verwendet, das auf der Massenspektrometrie basiert und gleichzeitig 191 Metaboliten messen kann. In zwei Gruppen von gesunden Teilnehmern konnten reproduzierbar Plasmametabolite festgestellt werden, wie etwa Gallensäuren, Abbauprodukte von Purin und Metabolite des Harnstoffzyklus, welche vorher nicht mit dem Glucose Metabolismus verknüpft worden sind. Die Dynamik der Metabolite ließ Aktionen des Insulins wie Proteolyse, Lipolyse, Ketogenese und Glykolyse erkennen, welche die Umschaltung von Katabolismus zu Anabolismus anzeigen. Im Kollektiv der Prädiabetiker fand man eine abgeschwächte Reaktion aller vier Eigenschaften des Insulins korrelierend mit Insulin-Resistenz. Weiters fand man, dass der Abfall von Glyzerin und Leucin/Isoleucin (Marker für Lipolyse bzw. für Proteolyse) der stärkste Prediktor für Insulinempfindlichkeit sind. Die Beobachtungen der Studie wiesen darauf hin, dass es Individuen gibt, die selektiv resistent für die Unterdrückung der Proteolyse sind, während andere eine selektive Resistenz gegenüber Lipolyse zeigen [Shaham 2008].

---

So geartete Studien metabolischer Profile werden in der Zukunft für viele chronische Erkrankungen Schritt für Schritt wertvolle Erkenntnisse liefern und es wird so gelingen, gestörte Stoffwechselvorgänge aufzudecken und ihnen gegebenenfalls entgegenzuwirken.



## **5 NUTRIGENOMIKS**

### **5.1 Was ist Nutrigenomiks**

Die Koppelung von Ernährung und zellulär-genetischen Prozessen des Organismus wird unter dem Begriff Nutrigenomiks zusammengefasst. Nutrigenomiks ist eine integrative Wissenschaft, die den Zusammenhang von molekularen genetischen Veränderungen, die durch Ernährung bedingt sind, aufzeigt und den Weg weist, wie Nahrung Gesundheit beeinflussen kann, indem der individuelle genetische Code verändert wird.

### **5.2 Grundsätze von Nutrigenomiks**

- Die Ernährung des Menschen wirkt sich auf das menschliche Genom aus und bewirkt direkt oder indirekt eine Veränderung der Genexpression oder –struktur.
- Unter bestimmten Bedingungen kann die Ernährung bei einigen Individuen einen erheblichen Risikofaktor für eine Vielzahl von Erkrankungen darstellen.
- Einige Gene, die durch die Nahrung reguliert werden, sind für den Beginn, die Inzidenz, die Progression und die Schwere von chronischen Erkrankungen prädisponiert.
- Der Schweregrad, die Balance zwischen Gesundheit und Krankheit, den Ernährung bewirken kann, hängt vom individuellen genetischen Code des Einzelnen ab.
- Ernährungsspezifische Interventionen basieren auf unserem Wissen von Nahrungsbedarf, dem Ernährungsstatus und dem Genotyp des Einzelnen, damit kann man versuchen, chronischen Erkrankungen vorzubeugen, sie zu mildern oder auch zu heilen [Kaput, 2004].

Aufkommende Technologien, die Gene, Proteine und Metaboliten erforschen, sollen es möglich machen, diese Informationen in Beziehung zu allen anderen biologischen Elementen, die in einer gegebenen Probe vorhanden sind, zu überprüfen. Daraus resultiert die Kreation populärer Termini, die mit dem griechischen Suffix „om“ enden, was so viel wie „komplett“ oder „alles“ bedeutet und die globale Analyse von Genen-Genomiks, mRNA-Transkriptomiks, Proteinen-Proteomiks und der Metaboliten-Metabolomiks bezeichnet.

### **5.3 Vorteile von Nutrigenomiks**

Wenn man epidemiologische Populationsstudien durchführt, ohne den genetischen Hintergrund zu kennen, kann das in falschen wissenschaftlichen Schlüssen enden und zu Fehlinformationen bei Ernährungsempfehlungen führen. Um das in Zukunft zu verhindern, hat man die Technologien und die unterstützende Software, die in der postgenomen Era ständig weiter entwickelt werden, zu nützen begonnen. Man kann damit die Zusammenhänge von den Molekülen, der Ernährung, ihren Einfluss auf Polymorphismen und das biologische System erforschen.

Vor der Sequenzierung des menschlichen Genoms war es nicht möglich, Studien zu machen, die eine einheitliche metabolische Annäherung auf die Frage, wie sich Ernährung auf den Beginn einer Erkrankung auswirkt, zeigen. Bei CVD musste man gewöhnlich gut charakterisierte BM verwenden, um das Verständnis für die verschiedenen Stadien einer Erkrankung zu verbessern, dazu gehört Cholesterin- und Triglyceridspiegel sowie CRP.

Wenn diese Studien auch fortwährend unser Verständnis der CVD verbessern, so führt das ständig zum gleichen Dilemma; diese Studien werden auf dem derzeitigen Dogma aufgebaut. Dadurch wird die Entdeckung von neuen Mechanismen und neuen BM, die den jeweiligen Gesundheitszustand besser

charakterisieren können, verhindert, da nur akzeptierte und charakterisierte Endpunkte geprüft werden. Nutrigenomische Techniken ermöglichen den Wissenschaftlern, früher nicht erkannte und unerwartete molekulare Endpunkte zu entdecken [Mutch 2005].

Die Bedeutung genetischer Variationen als Antwort auf bestimmte Nährstoffe ist teilweise gut beschrieben und wird in Zukunft noch umfassender werden. Es ist offensichtlich geworden, dass viele Polymorphismen CVD beeinflussen. Die Analyse der SNPs bietet ein gewaltiges molekulares Werkzeug, um die Rolle der Ernährung und ihre Auswirkung auf Polymorphismen zu erforschen.

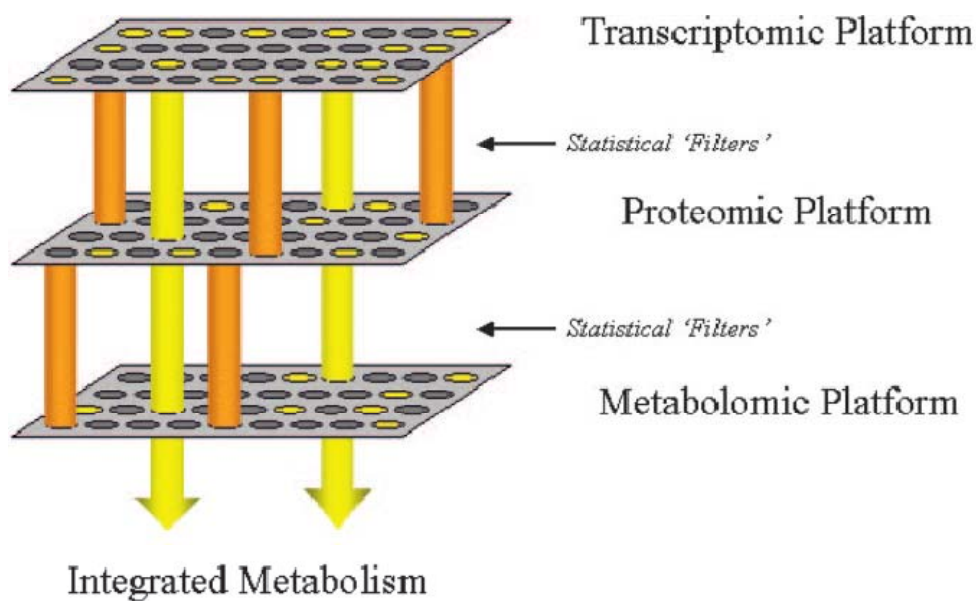
Der potentielle Einfluss von Ernährung auf das Genom darf nicht unterschätzt werden, es gibt jedoch gewisse Gene (Kandidatengene), die besonders empfänglich dafür sind. Die Identifizierung solcher Gene deckt sich zumindest mit einem oder mehreren der folgenden Punkte:

- Bei Genen, die während einer Erkrankung chronisch aktiviert sind, wurde schon früher gezeigt, dass sie sensitiv für ernährungsspezifische Interventionen sind.
- Gene mit wichtigen funktionellen Variationen
- Gene, die eine wichtige Rolle in der Hierarchie der biologischen Kaskade haben
- Polymorphismen, die in der Population prävalent sind
- Gene mit assoziierten BM, die klinische Studien müheloser wiedergeben [Mutch 2005]

## 5.4 Herausforderungen von Nutrigenomiks:

Das Ziel, gesunde Nahrung zu spezifizieren ist schwierig, da eine Unzahl von Nahrungsmolekülen im Rahmen einer einzigen Mahlzeit aufgenommen werden und die diversen Bestandteile unterschiedliche Wirkungen auf die Stoffwechselwege des Organismus haben. Vergleicht man dies mit der Einnahme eines pharmakologischen Wirkstoffes, so sieht man, wie sich bei Nahrung die Beeinflussung des Phänotyps an vielen molekularen Endpunkten verändert.

Durch die Integration von verschiedenen analytischen Ebenen will man die Menge der Daten, die vom wesentlichen ablenken und unwichtig sind, herausfiltern. Mit jeder verwendeten Technologie, wird in Summe die Menge der molekularen Endpunkte verringert, indem man nur auf jene sieht, die zwischen den experimentellen Ebenen liegen.



**Abbildung 14:** Integrierter Metabolismus

Der integrierte Metabolismus bietet einen reduktionistischen Ansatz, der die metabolische Funktionen von Nahrungsstoffen aufdeckt. Um die analytischen Limitationen jeder der Techniken zu minimieren, kombiniert man zwei bis drei von ihnen, konzentriert sich auf allgemeine Veränderungen, indem man die jeweils passenden statistischen Programme verwendet [nach Mutch 2005].

Obwohl es auf den ersten Blick scheint, dass durch den Gebrauch von mehreren Systemen Unmengen an Daten entstehen, kann man mit den geeigneten statistischen Methoden diese filtern und nur jene hervorheben, die wichtig sind. Um die analytischen Grenzen der einzelnen Methoden zu umgehen, sollte man zumindest zwei verwenden und sich auf gemeinsame Veränderungen konzentrieren, die durch die statistischen Programme identifiziert werden. So bekommt man eine - wenn auch reduktionistische - Annäherung an jene Wirkungen, die das Nahrungsmittel im biologischen System ausübt [Mutch 2005].

## **5.5 Transkriptomiks**

Das Transkriptom ist die Menge jener mRNA, die in einer Population von Zellen gebildet wird. Das Genom ist mehr oder weniger in einer Zelllinie fixiert, das Transkriptom variiert gemäß den äußeren Bedingungen. Da es alle mRNA inkludiert, die in der Zelle vorhanden sind, reflektiert es die Gene, die aktiv zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden.

Den Einfluss der Ernährung auf die Genexpression sieht man am besten bei den Transkriptionsfaktoren. Der wichtigste Sensor für ernährungsbedingte Änderungen ist die nukleare Rezeptor-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren (im menschlichen Genom ist die Anzahl 48). Viele dieser Rezeptoren binden Nahrungsbestandteile und deren Metaboliten. Während der Bindung an Liganden, wird der Rezeptor verändert, daraus resultiert eine koordinierte Dissoziation von Korepressoren und koaktivierte Proteine werden rekrutiert, welche die transkriptionelle Aktivierung ermöglichen.

In metabolisch aktiven Geweben wie Leber, Darm und Fettgewebe agieren diese Transkriptionsfaktoren als Sensoren für Nahrungsbestandteile und verändern den Spiegel der DNA Transkription an speziellen Genen als Antwort auf einen Wechsel in der Ernährung. Nukleare Rezeptoren erfüllen wichtige Funktionen;

sie regulieren verschiedene Prozesse wie den Metabolismus der Ernährung, die embryonale Entwicklung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung [Afman 2006].

Durch den Fortschritt der Molekularbiologie kann man rasche und zusammenfassende Analysen der Gene und ihrer Produkte machen.

Die ausgedehnten Studien aktiver und regulatorischer Gene mittels transkriptomischen Techniken wie die Verwendung von Microarrays<sup>23</sup> haben es ermöglicht, den molekularen Mechanismus und das regulatorische Netzwerk des biologischen Systems bei Krankheiten zu erforschen und mit geeigneten diätischen und medizinischen Mitteln dagegen anzukämpfen. Auch die globale Gen Expressionsanalyse wird auf diesem Gebiet verwendet. Heute werden dafür hauptsächlich zwei Systeme genommen, die DNA Microarrays und SAGE. (Sequentielle Analyse der Genexpression, bietet die Möglichkeit das Expressionsmuster von tausenden von Genen quantitativ zu erfassen) Auf genomweite Gen Expressionsstudien folgt dann eine genauere Untersuchung spezieller Gruppen von Genen, die vermuten lassen, dass sie möglicherweise eine Antwort auf die Frage der Studie geben können, da sie affiziert worden sind. Man kann dies durch individuell hergestellte Microarrays erreichen [Kussmann 2006].

## 5.6 Proteomiks

Es ist durch Interventionsstudien an Tieren und Menschen bekannt geworden, dass Nahrung das Protein Komplement sehr rasch beeinflusst (z.B. postprandial). Das geschieht vor allem in der Leber, aber auch in den zirkulierenden Blutzellen, wie etwa den peripheren mononuklearen Zellen des Blutes und den Thrombozyten. Mit der Zeit beeinflusst die Nahrungsaufnahme auch das

---

<sup>23</sup>Ein Microarray nutzt die Fähigkeit eines gegebenen mRNA Moleküls aus um an eine DNA Schablone zu binden oder zu hybridisieren, von welcher er abstammt.  
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>, (15.03.2010)]

Proteinkomplement der Zellen, z.B. durch Aufnahme von Fettsäuren in die Zellmembran.

Wenn man Proteomiks dazu verwendet, um Langzeiteffekte des Proteinkomplements auf ein biologisches System zu prüfen, dann bietet das gegenüber Transkriptomiks den Vorteil, dass es das funktionelle Protein der Genexpression misst. So kann die Identifikation der ernährungsbedingten Modifikation, welche sich auf Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen bezieht, festgestellt werden. Solche Proteine können nicht nur im Zielorgan eine Rolle spielen, sie beeinflussen auch andere Stoffwechselwege im Organismus. Proteomiks ist ein neu entstehendes und vielversprechendes Werkzeug, das Aktionsmechanismen sichtbar macht und diese Technik wird häufig dazu verwendet BM zu finden, die im normalen oder kranken Organismus aufscheinen. Derzeit ist der Gebrauch bei Interventionsstudien noch eingeschränkt, es ist schwierig, die biologische und analytische Variabilität, die subtile Effekte der Nahrungs-aufnahme maskieren kann, richtig einzuordnen. Dies sollte man aber in den Griff bekommen können. Es gibt einige Initiativen, die im Laufen sind, um die Präparation der Proben und die Proteomiks-Methoden sowie Protokolle der Auswertung zu standardisieren. Außerdem detektieren die meisten Proteomiks Techniken schwer die verschiedenartigen Regulationen der gering vorkommenden Proteine, die aber häufig klinisch relevant sind.

Obwohl die Qualität und die Empfindlichkeit der neuen Generation von Massenspektrometern (MS) die Entwicklung auf dem Gebiet von Proteomiks voran getrieben hat, gibt es nach wie vor MS bezogene Probleme, vor allem jene, die auf die falsch interpretierten Algorithmen, die in der Software verwendet werden, zurückzuführen sind. Man hofft in naher Zukunft mit MS die Proteine von komplexen biologischen Proben zu messen und zu quantifizieren, um das Verständnis der Änderungen im Proteom, die durch Nahrung bewirkt wird, zu vergrößern [de Roos 2009].

## 5.7 Metabolomik

Diese Disziplin beschäftigt sich mit der umfassenden Charakterisierung von kleinen Metaboliten ( $< 1500$  Dalton) in biologischen Systemen, gibt einen Überblick über den metabolischen Status und die globalen biochemischen Ereignisse in zellulären oder biologischen Systemen. Es wird sowohl das Gleichgewicht eines Systems als auch die dynamische Antwort von Zellen oder Organismen auf genetische, abiotische oder biotische Modulation der Umgebung gemessen [[http://129.128.185.121/metabolomics society](http://129.128.185.121/metabolomics_society) (03.01.2010)].

So werden Änderungen in der Verteilung und Konzentration eines breiten Spektrums von Metaboliten detektiert, Metaboliten werden als wichtige Indikatoren für den Phänotyp betrachtet und zur Klärung abnormer Prozesse, die durch differenzierte Genexpression, toxische Einflüsse und pathophysiologische Prozesse hervorgerufen werden, herangezogen.

Die Einflüsse, die auf das menschliche Metabolom einwirken sind extrinsischer (Nahrungsmittel, Medikamente, Bewegung, Stress) sowie intrinsischer Natur (die Zusammensetzung des Körpers, Stoffwechsel, Alter, Genotyp Gesundheitszustand, Schwangerschaft und Tag-Nacht-Rhythmus). Selbst wenn eine erste Veränderung ein kleiner Metabolit ist, der selbst nicht detektiert werden kann, finden Veränderungen an jedem Punkt des biologischen Netzwerks statt bis hin zu den Stoffwechselwegen hoch konnektierter Netzknoten, welche dann als metabolische Anzeige für eine Veränderung der Homöostase des biologischen Systems betrachtet werden [Gibney 2005].

Die Moleküle, mit denen Metabolomik zu tun hat, sind chemisch unterschiedlich, zusätzlich sind die Konzentrationen in ein und derselben Probe verschieden hoch. Diese zwei Faktoren zusätzlich zu der immensen Anzahl an Metaboliten gehören zu den großen Herausforderungen dieser Disziplin.



Die meisten Studien über Ernährung nehmen an, dass alle Menschen gleiche ernährungsspezifische Anforderungen haben und Studien beachten nicht die verschiedenen Bedürfnisse von Untergruppen der Studienteilnehmer, die einen anderen Nahrungsbedarf haben. Bei der statistischen Analyse kommt es dann zu großen Streuungen, die für die Nullhypothese<sup>24</sup> sprechen. Auf der Basis von nutrigenomischen oder metabolomischen Profilen könnte man bei Ernährungsstudien besser zwischen Respondern und nicht Respondern unterscheiden, die Sensibilität, Unterschiede aufzuspüren, könnte deutlich erhöht werden und die daraus resultierenden ernährungsspezifischen Ratschläge zielgerecht angepasst werden [Zeisel 2007].

---

<sup>24</sup> „Mit der Nullhypothese will man herausfinden, ob man Ergebnisse einer Analyse oder Tests verwerfen oder annehmen kann. Dabei wird näher darauf eingegangen, ob ein Ergebnis bloß zufällig zustande kam, oder ob es „echt“ ist.“ (<http://lexikon.stangl.eu/62/nullhypothese/> , (03.01.2010)



## 6 ERÄHRUNG-ERKRANKUNG GENETISCHE INTERAKTIONEN

Allgemeine chemische Bestandteile der Ernährung können die Genexpression verändern. Epidemiologische Studien zeigen wiederholt Assoziationen zwischen Nahrungsaufnahme und dem Auftreten und der Schwere von chronischen Erkrankungen. Das Konzept, dass Nahrung bioaktive Substanzen enthält, ist aus Assoziationstudien auf molekularer oder genetischer Ebene nicht ersichtlich, weder auf humaner, tierexperimenteller noch Zellkulturebene. Dies ist tatsächlich schwierig, nimmt man etwa die Zusammensetzung von Maiskeimöl, so findet man eine große Variation an Fettsäuren, Triglyceriden, Sterolen, Sterolestern und Tocopherolen. Diese Bestandteile haben verschiedene Effekte auf den Stoffwechsel des Körpers, weil sie in verschiedener Art aufgenommen und an die Zellen weiter gegeben werden.

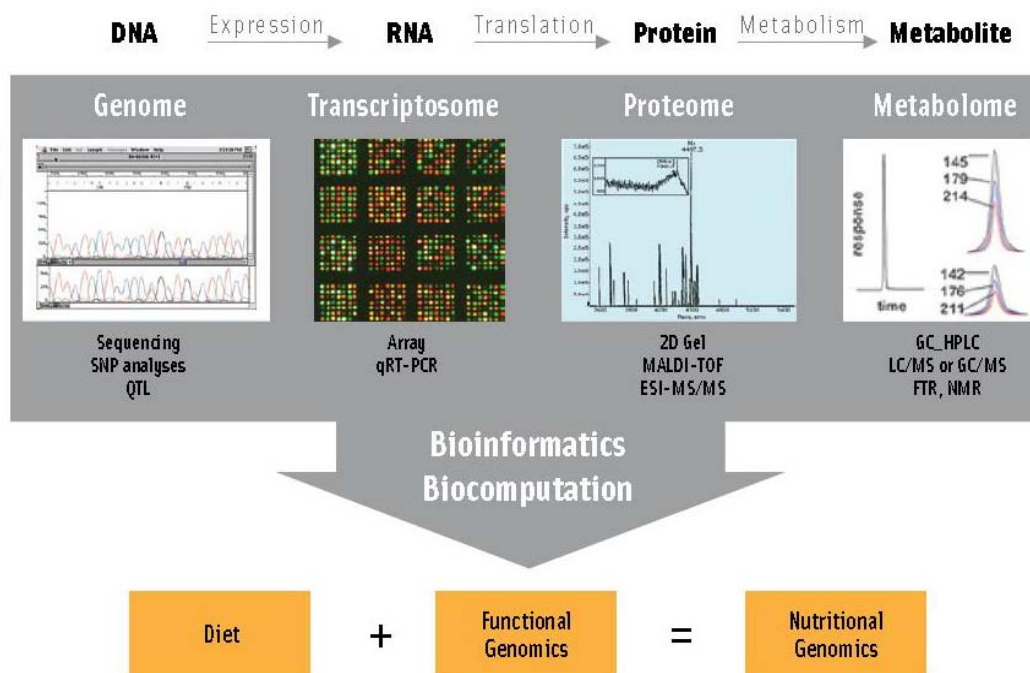
Chemische Stoffe in der Ernährung können Genexpressionen direkt oder indirekt auslösen. Auf zellulärer Ebene können Nahrungsstoffe als

- Liganden für Transkriptionsfaktoren agieren,
- auf primären oder sekundären metabolische Stoffwechselwegen verarbeitet werden und dabei die Konzentration von Substraten oder intermediärer Stoffwechselprodukte verändern
- positiv oder negativ Signalwege beeinflussen [Kaput 2004].

Epidemiologische Studien haben immer wieder gezeigt, dass verschiedene Arten der Ernährung mit Inzidenz und Schwere von Erkrankungen einhergehen. Zuviel an Energie, Proteinen, Fetten und Kohlehydraten oder Mangel an passenden Mikronährstoffen sind mit Adipositas, DM II und CVD vergesellschaftet. Man prüft dies an Hand von Kandidatengenen, von denen physiologische oder biochemische Varianten vorhanden sind und von welchen man annimmt, dass sie

das Risiko, eine Erkrankung zu entwickeln oder abzuschwächen, beinhalten, man nennt sie auch Gene mit erhöhter Empfänglichkeit.

## Die Omics-Technologien



**Abbildung 15:** Hochdurchsatzanalyse der DNA

DNA (Genomiks), RNA (Transkriptomiks), Protein (Proteomiks) oder Metaboliten (Metabolomiks) und die derzeit gebräuchlichen Untersuchungsmethoden. qRT-PCR: quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion, MALDI-TOF: Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-time of flight, ESI: Elektrospray Ionisation, GC: Gaschromatograph, NMR: Nuclear Magnetische Resonanz, FTR: Fourier Transformations Spektroskopie [Fogg-Johnson 2007].

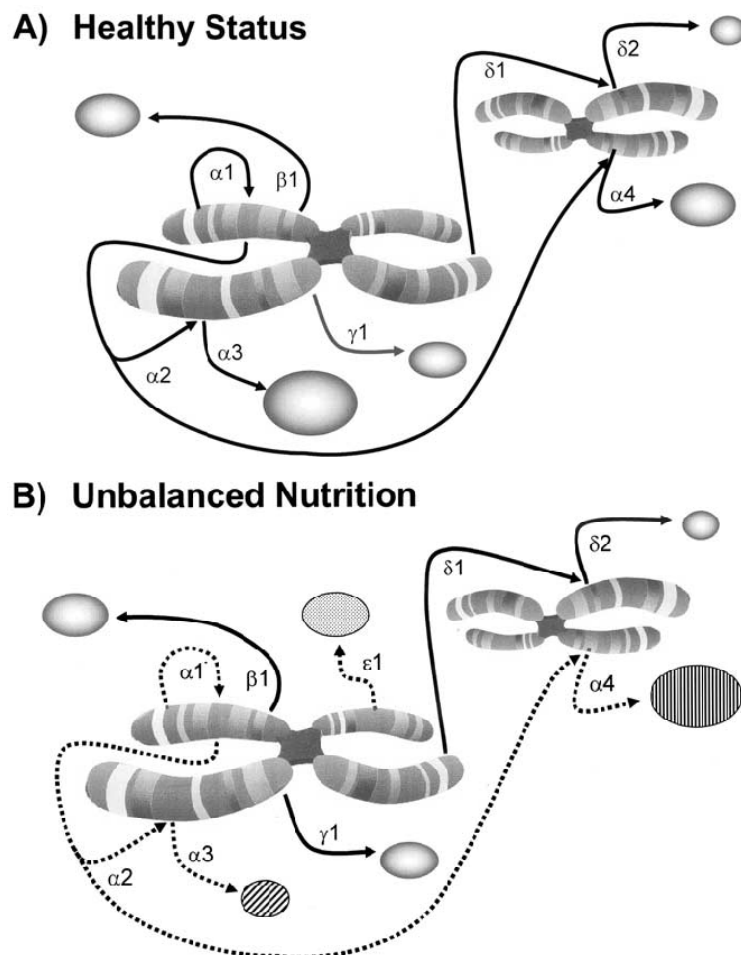
Challenge/association	Gene	OMIM
Lipid, diet, smoking, sex	Apolipoprotein-A1	107680
Lipid, diet, sex	Apolipoprotein-A4	107690
Lipid, diet, sex	Apolipoprotein-B	107730
Lipid, diet, smoking, sex	Apolipoprotein-C3	107720
Lipid, diet, smoking, activity	Apolipoprotein-E	107741
Smoking	Apolipoprotein-H	138700
Lipid, diet, smoking, activity	Lipoprotein lipase	238600
Lipid, diet, smoking, alcohol, sex	Cholesterol ester transfer protein	118470
Lipid	Lecithin:cholesterol acyltransferase	606967
Lipid, diet	LDL receptor	606945
Diet	Hepatic lipase	151670
Diet	Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase	118455
Diet	Intestinal fatty acid-binding protein	600422
Diet	Neuropeptidase Y	162640
Diet	M/N blood group	111300
Alcohol	Alcohol dehydrogenase-3	103730
Smoking, activity	Paraoxonase	168820
Diet	Microsomal transfer protein	157147

**Tabelle 8:** Liste der Kandidatengene, für die eine Assoziation bei verschiedenen Ernährungsformen gefunden worden ist

Kaput, einer der führenden Autoren auf diesem Gebiet, beanstandet die Mängel solcher Studien, z.B. sind die Resultate dieser oben angegebenen Assoziationen nur in den wenigsten Fällen repliziert worden, die Fallzahl der Studien sei zu gering, als dass sie eine passende statistische Power hätten, Kontrollgruppen, die nicht adäquat ausgesucht worden sind, Populationsstratifikationen, welche auftreten, weil verschiedene genetische Untergruppen unter den Studienteilnehmern vorhanden sind und die Überinterpretation der Daten. Variable, die man bis jetzt noch nicht in den Griff bekommen hat, die das Ergebnis solcher Studien stark beeinflussen sind:

- Die Diversität der molekularen Prozesse, die chronische Erkrankungen bewirken und die Tatsache, dass man eines oder nur wenige Kandidatengene untersucht
- Die physiologische Antwort im Stoffwechsel einer Erkrankung, kann die Expression der genetischen Information verändern

- Genotyp-Interaktionen mit der Umgebung
- Die Verwendung von Modellorganismen bei der Suche nach Kandidatengenen [Kaput et al. 2004].



**Abbildung 16:** Genotyp-Umweltinteraktionen

Beispiel der Genexpression bei gesundem (A) und unbalanziertem Ernährungsstatus: (A) Gen  $\alpha 1$  ist ein globaler Transkriptionsfaktor der  $\alpha 2$  (anderer Transkriptionsfaktor) reguliert.  $\alpha 2$  reguliert seinerseits  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  Expression. Ein anderer Transkriptionsfaktor,  $\delta 1$ , beeinflusst  $\delta 2$  expression. Gene, die  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ,  $\delta 1$  und  $\delta 2$  kodieren, werden nicht von Transkriptionsfaktoren, die die Ernährung beeinflusst gesteuert. (B) Unbalanzierte Ernährung verändert die Expression von  $\alpha 1$ , verringert die Menge von  $\alpha 3$  (schräg schraffierte kugelige Fläche), erhöht aber die Expression von  $\alpha 4$  (senkrecht schraffierte kugelige Fläche). Gen  $\epsilon 1$  wird als Antwort auf den veränderten Metabolismus

oder die veränderte Konzentration des durch Ernährung angebotenen Liganden exprimiert (getupfte runde Fläche). Einige Transkriptionsfaktoren oder die Expression von individuellen Genen mag nicht direkt oder indirekt durch Ernährung affiziert sein. (z.B.  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ,  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ) wohingegen andere ( $\alpha 1$  bis  $\alpha 4$  und  $\epsilon 1$ ) affiziert werden können. Diese Effekte auf die Transkription können aus einer höher konzentrierten Bindung von Liganden (durch die Ernährung) bedingt sein, die auf ein Referenzgen oder einen SNP Gen Sequenz einwirken. Wenn man die Konzentration der Effektorproteine ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\epsilon 1$ ) ändert, dann kommt es auch zu einer Änderung des metabolischen Flusses und der Konzentration der Metabolite, die weitere Veränderungen der Zellbiologie bewirken [Kaput et al. 2004].

## 6.1 Ernährung und CVD

Alter, Geschlecht und Genetik sind Risiken für CVD, die nicht verändert werden können; es ist möglich durch weitere Faktoren, die entweder kardioprotektiv oder abträglich für diese Erkrankung sind, das Risiko für CVD abzuschätzen und gegebenenfalls zu beeinflussen. Sie betreffen Menschen aller ethnischen Gruppen, weltweit und beide Geschlechter in gleichem Ausmaß und wirken auf die Atherogenese, die verantwortlich für CVD ist. Ernährungsspezifische Eingriffe können eine Modulation auf zellulärer Ebene bewirken und die proinflammatorischen Prozesse, Plaque Formationen und die Ruptur von Plaques beeinflussen. Durch die Interheart Studie, einer standardisierten Fall-Kontroll Studie, die potentielle, modifizierbare Risikofaktoren, welche mit frühzeitigem MI assoziiert sind, in 52 Ländern untersuchte (15.152 Fälle und 14.820 Kontrollen), wurde festgestellt, dass Faktoren wie pathologische Blutfettwerte (ratio von ApoB/ApoA1: sehr ähnlich dem Faktor LDL zu HDL), Rauchen, Hypertension, DM II, abdominelle Adipositas (waist to hip ratio), psychosoziale Faktoren, die Konsumation von Früchten und Gemüse, Alkohol und regelmäßige Bewegung mit dem Risiko für MI im negativen als auch im positiven zu 90 % das allgemeine Risiko für einen frühzeitigen MI erklärten, für alle Populationen so wie für Männer und Frauen.

Man sieht, dass die meisten der Faktoren durch Nahrungsaufnahme beeinflussbar sind und somit ist die enorme Bedeutung der Ernährung für den Formenkreis der CVD gut zu erkennen [Yusuf 2004, De Caterina 2006].

## **6.2 CVD und Fette**

Schon im 19. Jahrhundert gab es die ersten Anhaltspunkte für Fettstoffwechselstörungen. Es wurden Xanthome bei Kindern beschrieben - man hielt es damals für ein dermatologisches Problem - allerdings entwickelten einige dieser Jugendlichen frühzeitig ernsthafte Herzprobleme; heute weiss man, dass dies auf die familiäre Hypercholesterinämie zurückzuführen ist, die auf Mutationen im LDL Rezeptor beruht. Eine der ersten Verbindungen zwischen Blutfetten und Krankheiten stellte am Beginn des 20. Jahrhunderts Nikolaj N. Antschikow her, als er mit dem Cholesterin-gefütterten Hasen sein Modell für die Erforschung der Atherosklerose erstellte.

Fast 100 Jahre nach dem Experiment von Antschikow und 50 Jahre nach der 7-Länder Studie (Ancel Keys in Minnesota, und seine Kollegen in sieben Ländern stellten die Hypothese auf, dass MI und Insult auf Grund des Lebensstils und verschieden gearteter Ernährungsmuster, vor allem bezüglich Fett, in Relation zu Häufigkeit von CVD stünden; [<http://www.epi.umn.edu/research/7countries/overview.shtm>, (7.1.2010)], sind tausende Studien durchgeführt worden; die Frage über Ernährung und CVD ist trotzdem noch nicht eindeutig geklärt und der Zusammenhang von Ernährung-Cholesterinspiegel-CVD wird von einigen Wissenschaftlern skeptisch betrachtet.

Der Grund für die Kontroverse liegt wahrscheinlich darin, dass eine komplexe Erkrankung wie CVD nicht auf einer einzigen Ursache beruht, das Prinzip „one size fits all“ kann man hier nicht anwenden und außerdem haben die Menschen ihr individuelles genetisches Makeup. Bedenkt man die unzähligen Variationen, die sich sowohl genetisch als auch durch Umweltfaktoren anbieten, so liegt die



Herausforderung darin herauszufinden, was für den Einzelnen gut ist [Ordovas 2006].

Man braucht aber gewisse Richtlinien für die Nahrungsaufnahme, die einen allgemeinen Schutz vor CVD geben soll. Risikofaktoren wie erhöhtes LDL-C und erniedrigtes HDL-C, erhöhte Serumkonzentrationen von Lipoprotein (a), Remnant-Lipoproteinen und Homocystein haben sich als atherogen erwiesen. Soweit es möglich ist, sollte man durch Ernährung, die restriktiv in Bezug auf gesättigte Fettsäuren und Cholesterin ist, dafür essentielle Fettsäuren bietet, gestörtem Lipoproteinstoffwechsel entgegenwirken oder es erst gar nicht soweit kommen lassen. Die Variabilität der LDL-C Antwort auf Nahrungsaufnahme ist allerdings weit gestreut, was teilweise auf die ApoE und ApoA4 Genotypen zurückzuführen ist [Schaefer 2002].

Genetische Varianten für viele Gene, die in den Fettstoffwechsel eingreifen, sind in den letzten zwei Jahrzehnten studiert worden, es gibt ein Überangebot von Studien über Genfaktoren mit abnormen Lipidmetabolismus und Plasmalipoprotein-Profilen, die ein Krankheitsrisiko in sich tragen [Ordovas 2006]. Verschiedene genetische Risikofaktoren lösen die Erhöhung von Lipoproteinen im Blut aus. Betrachtet man Lipoprotein(a) [Lp(a)], so weiß man heute, dass der DD-Genotyp des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) und auch erhöhte Homozysteinspiegel dazu beitragen können; dieses kleine Stellglied in der Komplexität des genetischen Anteils, der zur Atherosklerose führt, zu beeinflussen [Doevendans 2001].

Nach Meinung von Jose Ordovas, (Nutrition und Genomics Labor der Tufts Universität in Boston) der sich hauptsächlich mit CVD und dem Lipidmetabolismus beschäftigt, haben nur einige Gene bezüglich des Lipidstoffwechsels eine Konsistenz in ihrer Assoziation gezeigt.

Lipoproteine sind makromolekulare Komplexe von Lipiden und Proteinen, welche hauptsächlich in der Leber und im Darm synthetisiert werden, sie sind am Transport und der Verteilung der Lipide im Körper notwendig.

Lipid- und Lipoproteinmetabolismus können als komplexer biologischer Stoffwechselweg gesehen werden. Die Homöostase der Lipide kommt durch die koordinierte Aktion einer Vielzahl von nuklearen Faktoren, Bindungsproteinen, Apolipoproteinen, Enzymen und Rezeptoren, die hunderte von Genen inkludieren, zustande. Dieser Metabolismus ist auch mit dem Energiestoffwechsel eng verknüpft und wird durch viele Hormone kontrolliert.

Der Stoffwechsel der Lipide wird mit der Entstehung der Atherosklerose eng verknüpft, das ist der Grund, warum im Rahmen der Prävention von CVD versucht wird, den erhöhten Cholesterinspiegel zu senken. Die Kriterien dafür werden auf der ganzen Welt von verschiedenen Gremien, die Gesundheitsrichtlinien herausgeben, festgelegt.

Der erste Schritt, um Lipidwerte den heute vorgegebenen Standards anzugleichen, soll durch Veränderung der Nahrungsaufnahme geschehen. Die empfohlene tägliche Aufnahme von gesättigten Fettsäuren sollte bei 7% der täglichen Energieaufnahme liegen, es dürfen 200mg Cholesterin/die zugeführt werden, Ballaststoffaufnahme von 10-24g/die und pflanzliche Sterole 2g/die, um die LDL-C Spiegel zu senken, werden empfohlen (nach National Cholesterol Education Program). Da es derzeit noch unmöglich ist, die Lipidwerte im Plasma individuell durch Diät alleine anzupassen, wird in jenen Fällen, wo Diät kein Auslangen findet, die medikamentöse Therapie eingesetzt.

Schon 1933 wurde festgestellt, dass es unter Studienteilnehmern eine verblüffende Vielfalt der Lipidspiegel als Antwort auf ein und dieselbe Ernährungsform gab. Studien an Tiermodellen und bei Menschen haben gezeigt, dass die Ursache dafür die genetische Komponente ist. (Ordovas 2009)

Die Richtlinien zur Minderung des Risikos für CVD werden derzeit durch die Lipid- bzw an den Lipoproteinwerten im Blut festgelegt. Nach Schätzungen ist die Vererbung von Blutfettwerten ziemlich hoch, 40-60% für HDL Cholesterin, 40-50% für LDL Cholesterin und 35-48 für Triglyceride.

Die genetische Variabilität der Kandidatengene, die in den Lipoproteinstoffwechsel verwickelt sind, werden mit abnormalem Fettstoffwechsel und Plasmalipoproteinprofilen in Verbindung gebracht, die Wegbereiter für die Atherosklerose sein können, weiters sind auch Reaktionen verschiedener Kandidatengene als Antwort auf Nahrungsaufnahme zahlreich beschrieben [Ordovas 2009].

Heute weiß man auf Grund einiger Kandidatengene (z.B. ApoA1, ApoA5, ApoE, hepatische Lipase), die in den Lipidmetabolismus involviert sind, dass es Individuen gibt, die von einer fettreduzierten Diät profitieren, wohingegen andere eher auf eine Diät mit einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren positiv reagieren.

Wachsendes Interesse gilt auch der Tatsache, dass bezüglich des Risikos für CVD die Zufuhr von n-6 und n-3 PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acids) bei verschiedenen genetischen Varianten unterschiedliche Wirkung haben, einige Menschen profitieren von einer vermehrten Zufuhr an n-3 PUFA, während für andere die erhöhte Aufnahme von n-6 PUFAs ungünstig sein kann. Betrachtet man die bedrohliche Zunahme an Fettleibigkeit, so ist es wichtig, den Effekt der Adipositas als Trigger für die Assoziation von genetischen Varianten und kardialen Risikofaktoren wie ApoE und ApoA5 zu verstehen [Ordovas 2006].

### 6.2.1 Apolipoprotein E (ApoE)

Apo E ist eine strukturelle Komponente der meisten Klassen von Lipoproteinpartikeln. Es dient unter anderem als Ligand für die Aufnahme von Lipoproteinen, dieser Vorgang wird durch einen Rezeptor an der Zelloberfläche mediiert [Ordovas 2002].

Durch ApoE werden die Remnants von Chylomikronen in der Leber aufgenommen, der Abbau von VLDL-remnants und die Umwandlung zu LDL Cholesterin wird gesteuert [Bauernfeind 2006]. Es gibt einen häufigen Polymorphismus des ApoE Gens (rs429358, rs7412), welches die drei größeren Isoformen des menschlichen ApoE kodiert. ApoE2, ApoE3 und ApoE4 werden von drei kodominanten Allelen gebildet, E2, E3 und E4. Populationsstudien zeigen einheitlich eine Assoziation zwischen ApoE und den Plasmakonzentrationen des Gesamtcholesterin (TC), Low-density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL C) und ApoB. Im allgemeinen haben die ApoE Allele in der Reihenfolge E2, E3 und E4 eine positive Assoziation mit höheren Konzentrationen dieser Plasmalipide [Burmana 2009]. Diese Assoziationen weisen auf eine bedeutende Verbindung des ApoE Locus zu CVD hin. Neben den Populationsstudien haben die genetischen Variationen des ApoE Locus eine große Bedeutung, weil sie die individuellen Reaktionen der Menschen auf Nahrungsaufnahme oder medikamentöse Therapie erklären können, die primär zur Normalisierung der Blutfettwerte unternommen werden.

Während das ApoE4 Allel häufiger eine Reaktion auf diätetische Interventionen zeigt, so reagieren ApoE2 Träger eher auf Statin Therapie. Wie es dazu kommt, ist noch Gegenstand der Forschung [Ordovas 2002].

Apo	Dichteklassen	Masse (kDa)	Konzentration (mg/l)	Funktion
A-I	HDL	28.5	1200-1400	Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor, Strukturprotein
A-II	HDL	17	350-500	Aktivierung der hepatischen Lipase ?
A-IV	Chylo, HDL	46	<50	Aktivierung der LCAT, putativer Sättigungsfaktor
A-V	HDL	39	?	Noch unbekannte Rolle im Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine [92,132]
B-100	VLDL, IDL	550	700-900	Bindung an LDL-Rezeptor, Strukturprotein
B-48	Chylo, VLDL	265	<50	Strukturprotein der Chylo
C-I	Chylo, VLDL	6.5	50-80	Aktivierung der LCAT
C-II	Chylo, VLDL	8.8	30-70	Aktivierung der LPL
C-III	Chylo, VLDL	8.9	100-120	Inhibitor der LPL
D	HDL	29	80-100	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	Chylo, VLDL, HDL	34	30-50	Ligand für LDL-Rezeptor und LRP
J	HDL	80	ca. 100	„Clusterin“ unbekannte Funktion im HDL-Stoffwechsel; Rolle in der Apoptose [22,81]
a	Lp(a)	350-900	Variabel	Unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse

**Tabelle 9:** Apolipoproteine im menschlichen Plasma [Sattler 2002]

Zusätzlich zur Funktion im Lipoprotein Metabolismus wird ApoE auch mit anderen Funktionen in Zusammenhang gebracht:

- antioxidierend
- thrombozytenaggregationshemmend
- antiproliferativ und neuroprotektiv
- immunmodulierend
- induziert bei Zellsignal - Transduktion die Akt/Protein Kinase B Phosphorylierung.

Außerdem diskutiert man seine positive Wirkung in Bezug auf Langlebigkeit und die Mitwirkung beim Ausbruch der Alzheimer Erkrankung.

Die ApoE3-Isoform wird für die „physiologische“ Variante des Apolipoproteins gehalten, die ApoE2 und ApoE4 Isoformen verändern den Lipidmetabolismus. Diese drei Isoformen differieren an der Aminosäureposition 112 und 158. Die Isoform ApoE3 enthält einen Cystein- und Argininrest an diesen Positionen, es vermittelt die Interaktion von ApoE3-haltigen Lipoproteinen mit dem LDL-Rezeptor und mit dem Chylomikronen-Remnant-ApoE3-Rezeptor. Als Konsequenz ergibt sich, dass ApoE3 eine wichtige Rolle für den Metabolismus von verschiedenen Klassen von Lipoproteinen inne hat und eine zentrale Funktion im Cholesterinstoffwechsel darstellt. Die Isoform ApoE2 wird mit der Hyperlipidämie Typ III assoziiert, Polymorphismen bei ApoE4 werden mit neurodegenerativen Störungen wie z.B. Alzheimer in Zusammenhang gebracht [Bolanos-Garcia 2003].

Die Assoziation von ApoE4-Isoformen mit erhöhtem Cholesterinspiegel ist in jenen Populationen größer, wo Nahrung mit einem höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin aufgenommen wird als solchen, wo dies nicht der Fall ist. Diese Daten zeigen, dass höhere LDL-Spiegel bei Trägern der ApoE4-Isoform durch Nahrungsaufnahme erreicht werden, was bei Trägern anderer Isoformen nicht der Fall sein muss.

Wenn ein Mangel an ApoE vorhanden ist, dann kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Cholesterin-angereicherten Lipoproteinen der Dichte 1.006 g/ml, welche ApoB-48, ApoA IV und ApoB-100 enthalten. Es kommt bei dieser Störung zu einer verzögerten Clearance von ApoB-100 und ApoB-48 innerhalb von triacylglycerolreichen Lipoproteinen.

Das ApoE-Gen soll auch zu jenen genetischen Faktoren gehören, die die Variabilität der postprandialen lipämischen Antwort verursachen. Die ApoE2 Isoform soll die Clearance der Remnants vermindern, weil eine beeinträchtigte

Affinität zu den Rezeptoren vorhanden ist. Im Gegensatz dazu verbessert die ApoE4-Isoform diese Affinität.

Es ist zu erwähnen, dass viele Studien, welche postprandiale Triglyceridspiegel untersuchten, die ApoE Genotypen nicht getrennt geprüft hatten und dadurch widersprüchliche Resultate aufgetreten waren, vor allem jene Effekte, die mit der ApoE4 Isoform in Verbindung gebracht worden waren.

Boerwinkle et al., nahmen Studienteilnehmer aus der Biethnischen Atherosclerosis Risk in Communities Studie und untersuchten auf postprandiale Lipämie, um den Effekt des ApoE Polymorphismus anhand der Höhe des Lipidspiegels zu quantifizieren. Das Profil der postprandialen Antwort auf eine fettreiche Mahlzeit im Plasma wurde an 474 Probanden mittels Werten von Triglyceriden, triglyceridreichen Lipoproteintriglyceriden, der ApoB-48/ApoB-100 Ratio und Retinylpalmitat erstellt. Der ApoE Polymorphismus wurde durch DNA Amplifikation und Verdau bestimmt. Die Blutwerte wurden nach vier und acht Stunden kontrolliert. Um die Lipoproteinsynthese des Darms zu messen, war Vitamin A der Mahlzeit zugefügt worden. Die postprandiale Antwort des Plasmaretinylpalmitat unterschied sich signifikant unter den ApoE Genotypen, es kam zu einer verzögerten Clearance bei Trägern des ApoE2 Allels verglichen mit E3/3 und E3/4. Die Messwerte der anderen Lipidfaktoren ergaben keine ersichtlichen Konzentrationsunterschiede unter den Studienteilnehmern. Man nimmt an, dass die Triglyceridkonzentration und die der triglyceridreichen Lipoproteine zu wenig sensitiv waren, um einen Effekt zu zeigen [Boerwinkle 1994].

Die postprandiale Antwort auf eine Testmahlzeit zeigte in einer finnischen Studie [Nikkila 1994], die Patienten mit CVD gesunden Probanden gegenüberstellte, dass CVD Patienten mit dem ApoE2/3 Phänotyp die höchsten Triglyceridwerte hatten, diese noch nach 7 Stunden weiter anstiegen, woraus man eine verzögerte Clearance der Chylomikronen Remnants ableiten konnte.

Ähnliche Effekte wurden auch bei Studien an Patienten mit normalen Triglyceridspiegel beobachtet, solche die einen nicht insulinpflichtigen DM II hatten und Studienteilnehmern, die normale Blutfettwerte und keinen DM II hatten.

Resultate für Studien über das ApoE4 Allel sind sehr widersprüchlich. Einerseits gibt es die Beobachtung, dass bei genetischer Variabilität dieses Allels eine weniger ausgeprägte lipämische Antwort verglichen mit anderen Phänotypen erfolgt [Weintraub 1987], Auf der anderen Seite gibt es eine Studie, wo das ApoE4 Allel mit einer verlängerten lipämischen Antwort bezüglich, Triglyceriden, Apolipoproteinen und triacylglycerinreichen Lipoproteinen reagiert hat [Bergeron 1996].

Es sind verschiedene Mechanismen vorgeschlagen worden, um diese widersprüchlichen Ergebnisse als Reaktion auf einen Reiz durch Nahrungszufuhr zu erklären. Einige Studien haben gezeigt, dass die intestinale Cholesterinabsorption vom ApoE Phänotyp abhängt, bei ApoE4 wird mehr Cholesterin absorbiert als bei Individuen, die dieses Allel nicht tragen. Andere Mechanismen wie unterschiedliche Verteilung von ApoE auf der Lipoproteinfraktion, die LDL ApoB Produktion, die Synthese von Gallensaft und Cholesterin ebenso wie postprandiale Lipoproteinclearance können ursächlich dazu beitragen [Ordovas 2009]. Es ist auch möglich, dass die Anzahl der Studienteilnehmer in den Untersuchungen zu gering war, um eine aussagekräftige statistische Power bezüglich ApoE Polymorphismus und Antwort des Cholesterins zu bekommen, es könnte der Polymorphismus nur bei Männern wirksam sein, oder bei Populationen, wo die Basiswerte des Gesamtcholesterins und LDL Cholesterins unter den verschiedenen ApoE Genotypen unterschiedlich ist [Weggemans 2001].

Andere genetische Varianten innerhalb des ApoE Locus sind in Beziehung zu der Assoziation mit Lipid Phänotypen und als Antwort auf Reize durch Nahrungsaufnahme gebracht worden. Heute nimmt man an, dass die Variabilität



in der ApoE Promotorregion unabhängig zum ApoE2, E3 und E4 Allel einen Einfluss auf die Plasmalipidwerte hat, sei es nun als Reaktion auf Ernährung oder auch als Risikofaktor für CVD [Ordovas 2009].

In einer 2007 veröffentlichten Studie (Teilnehmer wurden aus der Copenhagen City Heart Study gewählt) wurde untersucht, wie hoch das Risiko einer ischämischen Herzerkrankung (IHD) bei den Genotypen A560T832/A560T832, A560T832/A560G832 und A560T832/T560T832 (dies sind Variationen zweier nicht kodierender SNPs in der 5' Promotor Region des ApoE Gens) ist. Diese Genotypen waren gewählt worden, weil sie kennzeichnend für hohe oder niedrige Spiegel von HDL-C, Triglyceride (TG) und/oder Gesamtcholesterin (TC) bezüglich Geschlecht und Population in einer früheren Studie dieser Forschergruppe gewesen waren. Es konnte festgestellt werden, dass Frauen mit dem Genotyp A560T832/T560T832 ein signifikant höheres Risiko hatten, an IHD zu erkranken. Dieses höhere Risiko blieb auch nach Anpassung der Effekte von Dyslipidämie und anderen Risikofaktoren für IHD vorhanden. Auch die Inkludierung der Isoformen, welche durch die Variationen in den zwei nicht synonymen kodierenden SNPs im ApoE Gen an Position 3937 and 4075 liegen, änderte nichts am Resultat. Bei Männern konnte die Beziehung zwischen diesem Genotyp und IHD nicht gefunden werden [Stengard 2007].

### **6.2.2 Apolipoprotein A-V**

Apolipoprotein A-V (ApoA-V) wurde 2001 durch vergleichendes Sequenzieren und als Leber Regenerationsprotein entdeckt. Das Gen ist am APOA1/C3/A4/A5 Gen Cluster auf Chromosom 11q23 lokalisiert. Dieser Ort ist gut bekannt, da er eine große Rolle bei der Regulierung des Plasmacholesterins und der Triglyceride (TG) spielt. ApoA-V wird in der Leber gebildet und die Plasmakonzentrationen bewegen sich zwischen 0.1-0.4 mg/ml.

Bei Mäusen, die ApoA-V nicht haben, fand man, dass die TG Spiegel vier Mal höher sind, bei vermehrter Produktion von ApoA-V kommt es zu einer 40% Verminderung der Plasma TG.

Man nimmt auf Grund metabolischer in vivo Studien an, dass ApoA-V den Katabolismus der triglyceridreichen Lipoproteine erhöht und die intestinale und hepatische Produktion dieser Lipoproteine nicht beeinflusst. Indem ApoA-V die an Proteoglykane gebundene Lipoproteinlipase (LPL) aktiviert, erhöht ApoA-V die Hydrolyse der TG aus VLDL und Chylomikronen, das geschieht unabhängig von anderen Apoproteinen.

Es wurden schon verschiedene Variationen am ApoA-V Genlocus beim Menschen entdeckt, [49 humane SNPs, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (02.02.2010)] leider gibt es kaum Daten zu ihrer funktionellen Relevanz.

Einige SNPs sind mit signifikant höheren Plasma TG Spiegel bei Patienten in Verbindung gebracht worden, z.B. j1131T>C, S19W, G185C, diese SNPs verändern auch die Antwort des Körpers auf Fibrate und beeinflussen die Adipositas. Insgesamt sind die Daten von ApoA-V Variationen und CVD inkonsistent [Kluger 2008]. Viele der Studien zu diesem Thema sind im chinesischen und koreanischen Raum gemacht worden und nicht aussagekräftig. [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=116519&log\\$=genesensor5&logdbfrom=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=116519&log$=genesensor5&logdbfrom=pubmed), (04.02.2010)].

Es gibt eine interessante Studie von Jian Wang, die in Nature (2008) erschienen ist. Es wurden zwei häufige SNPs des APOA5, der S19W und -1131T>C Genotyp, mit Variationen bekannter Kandidatengene, die Hyperlipoproteinämie diagnostizieren, assoziiert.

Es wurde eine schrittweise Beziehung zwischen der Häufigkeit von APOA5 Minor Allel Trägern und den Quartilen der Plasmatriglyceride beobachtet. Die Odds Ratio für Hyperlipoproteinämie vom Typ 2B, 3, 4 und 5 in APOA5 S19W

Trägern war 3.11 (95% CI 1.63–5.95), 4.76 (2.25–10.1), 2.89 (1.17–7.18) und 6.16 (3.66–10.3). Für APOA5 –1131T>C Träger, war die Odds Ratio für diese oben angeführte Hyperlipoproteinämien 2.23 (95% CI 1.89–3.52). Die Autoren konnten daraus den Schluss ziehen, dass ein hoher Anteil der Patienten, die Träger der vier klassischen Hyperlipoproteinämie Phänotypen sind auch die APOA5 S19W oder –1131T>C Variante manchmal auch beide genetisch festgelegt haben. Diese Varianten könnte man auch als genetische BM für eine Reihe von klinischen Hyperlipoproteinämien Phänotypen, die mit erhöhtem Triglyceridspiegel einhergehen, verwenden [Wang 2008].

### 6.2.3 Lipoproteinlipase

Die Lipoproteinlipase (LPL, E.C. 3.1.1.34) ist ein Schlüsselenzym des Lipidmetabolismus. Fettleibigkeit, KHK und Atherosklerose scheinen direkt oder indirekt mit einer gestörten Funktion der LPL verbunden zu sein. Die menschliche LPL gehört zur Superfamilie der Lipasen, welche die hepatische und pankreatische Lipase inkludieren. Diese Lipasen sind durch extreme Homologie gekennzeichnet, sowohl auf der genetischen als auch auf der Ebene des fertigen Proteins. Daraus kann man schließen, dass sie eine gemeinsame evolutionäre Entwicklung haben [Murthy 1996].

LPL reguliert die Plasmaspiegel von Triglyceriden (TG) und HDL (High Density Lipoprotein). Es hydrolysiert Plasma TG, welche in Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) gepackt sind. Durch diese katalytische Aktivität entstehen cholesterinreiche Lipoprotein Remnants und es werden Bestandteile für die Bildung des HDL-Pools erstellt, welcher antiatherogen wirksam ist. LPL erhöht die hepatische Clearance für atherogene Lipoprotein-Remnants über den LDL Rezeptor. Wie wichtig dieses Enzym für den Lipidstoffwechsel ist, sieht man beim genetischen Ausfall der LPL, einer seltenen Anomalie, die durch schwere Hypertriglycerinämie und niedrigen HDL Spiegeln gekennzeichnet ist.

Kategorie	Lipoproteinlipase (LPL)	Hepatische Lipase (HTGL)	Pankreaslipase (PL)	Endotheliale Lipase (EL)
Chromosomlokation	8p22	15q21–q23	10q24–q26	18q21.1
Gensymbol	LIPD	LIPC	PNLIP	LIPG
Gene id	NM_000237	NM_000236	NM_000936	NM_006033
Protein id	NP_000228	NP_000227	NP_000927	NP_006024
Enzymklassifikation	3.1.1.34	3.1.1.3	3.1.1.3	3.1.1.3
Syntheseort	Muskel-, Fettgewebe, Makrophagen	Leber	Pankreas	Endothelzellen, Makrophagen
Funktion	Triacylhydrolase	Triacylhydrolase	Triacylhydrolase	Phospholipase

**Tabelle 10:** Die Lipasefamilie und ihre Mitglieder [Rip 2007]

### 6.2.3.1 Biologie der Lipoprotein Lipase

Um besser zu verstehen, wie niedrige Spiegel von LPL im Plasma das kardiovaskuläre Risiko erhöhen, kann man auf eine Idee von Tornval et al. zurückgreifen, die meinen, dass dieser Parameter ein kataboles Produkt der biologisch aktiven LPL ist. Es gibt verschiedene Hinweise, die die Vermutung verstärken, dass dieser Parameter die gesamte Menge der Körperproduktion an LPL darstellt.

- Von Peroxisom Proliferated Activated Receptor (PPAR)<sup>25</sup>, alpha und gamma Agonisten, weiss man, dass sie die LPL Genexpression und somit die Serum LPL Spiegel erhöhen.
- Insulinspiegel, welche die LPL Gen Expression Spiegel beeinflussen, wirken auch auf die LPL Konzentrationen
- In einer Studie hat man festgestellt, dass Variationen am LPL Genlocus auch Einfluss auf die LPL Spiegel haben. Im Speziellen wurde gezeigt, dass Träger einer gewöhnlichen LPL Variante (LPLS447X) erhöhte LPL

<sup>25</sup> Sind durch Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zu der Superfamilie der nuklearen Rezeptoren gehören. [<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/content/short/169/3/453> (15.03.2010)]

Spiegel haben, diesen Hinweis nützten andere Autoren und zeigten, dass dies mit einer verminderten Anfälligkeit für CVD zusammenhängt.

Daher kann man annehmen, dass Serum LPL Konzentrationen ein Marker für die Menge an systemisch (katalytisch) vorhandenem aktiver LPL sind, vor allem wenn man in Betracht zieht, dass es das einzige lipolytische Enzym ist, welches die Plasmatriglyceride zerlegt. Die LPL-Menge hat auch einen direkten atherogenen Effekt, indem sie die Clearance der atherogenen Lipoprotein Remnants vermittelt [Rip 2006]. Diese werden dann von Makrophagen phagozytiert und können zu Schaumzellen degenerieren, wodurch die Atherosklerose verschlimmert wird. Da die LPL das zentrale und entscheidende Enzym im Lipidmetabismus ist, steht sie auch in Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie Adipositas, DM II und Atherosklerose.

Die Rolle der LPL in der Atherogenese kann sowohl positiv als auch negativ gesehen werden, eine schützende Funktion scheint sie in Muskel und Fettgewebe zu haben, wo es durch die kapilläre Lipase zur Beseitigung von Fetten aus dem Blut kommt und die HDL Fraktion erhöht wird. Betrachtet man die Synthese der LPL in Makrophagen, so kommt ein atherogener Effekt zustande, da die Aufnahme von Lipiden in die Zellen erleichtert wird. Die LPL stimuliert auch die Proliferation der glatten Muskelzellen und steigert die Adhäsion von Monozyten. Nach dem heutigen Wissenstand kommt es auf den Ort an, wo LPL exprimiert wird, proatherogene Wirkung wird bei Abgabe des Enzyms in Myo- und Adipozyten entfaltet, wohingegen in der arteriellen Gefäßwand die Rolle des Enzyms atherosklerosefördernde Wirkung hat [Reinbold 2007].

LPL Konzentrationen und das Risiko von CVD, die möglicherweise in der Zukunft auftreten, wurde mit der Population der Epic Norfolk Studie untersucht. Die LPL Konzentrationen wurden im Serum von Männern und Frauen gemessen, welche entweder eine fatale oder nicht fatale koronare Herzerkrankung entwickelten. Der Zeitraum erstreckte sich über sieben Jahre. Für jeden letalen Fall der Studienteilnehmer, waren zwei Kontrollen vorhanden, die nach Alter,

Geschlecht und verstrichener Zeitspanne angepasst waren. Dabei sah man, dass die Verstorbenen im Vergleich zu den lebenden Individuen niedrigere LPL Werte hatten. Jene Teilnehmer, die im höchsten Quartil - bezogen auf LPL Konzentration – lagen, hatten ein um 34% geringeres Risiko eine KHK zu entwickeln als jene im niedrigsten Quartil (OR 0.66; Konfidenz Intervall [CI], 0.53 bis 0.83;  $P < 0.0001$ ).

Dieser Effekt blieb auch bestehen, wenn man die Werte für Blutdruck, Diabetes, Rauchen, BMI, LDL und Cholesterin adjustierte (OR, 0.77; CI, 0.60–0.99;  $P = 0.02$ ). Wie man auf Grund der Biologie der LPL erwarten kann, wurde durch Adjustierung von HDL-C oder TG die statistische Signifikanz gemindert. Als interessantes, aber nicht beabsichtigtes, Ergebnis konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Serum LPL Konzentrationen positiv linear mit der Größe von HDL und LDL korrelierten. Aus diesen Daten kann man ableiten, dass hohe LPL Konzentrationen atheroprotektiv durch die erniedrigte Triglycerid- und erhöhten HDL Spiegel wirken. Es muss erwähnt werden, dass diese Studie mit einem hoch sensitiven Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt wurde, mit dem genau die frei zirkulierenden Mengen an LPL Konzentrationen ohne Verwendung von heparinisiertem Serum festgestellt werden konnten. Dadurch wird der Bezug von LPL zu CVD leichter hergestellt. Es wurde erkannt, dass der Großteil an Serum LPL katalytisch inaktiv ist und nur ein kataboles Produkt von katalytisch aktiver LPL darstellt, welche an das Endothel gebunden ist. Es ist bestätigt, dass das durch LPL Elisa gemessene LPL im Serum nicht mit dem LPL Konzentrationen, die nach Heparinisierung gemessen werden, assoziiert werden kann [Rip 2006].

#### **6.2.3.2 LPL Expression Tiermodell**

LPL ist ein multifunktionales Enzym, welches von vielen Geweben produziert wird. Dazu gehören Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel, Inselzellen des Pankreas und Makrophagen. Die Aufrechterhaltung der Menge an LPL wird

transkriptionell, posttranskriptionell und posttranslational geregelt, Ernährungszustand, Hormonspiegel und eine Vielzahl von Proteinen haben Einfluss darauf. Es wurden transgene und knockout Mausmodelle entwickelt, die gewebespezifisch LPL produzieren. Man konnte feststellen, dass Mäuse, die zuviel an LPL im Skelettmuskel bildeten, TG im Muskel anhäuften und Insulinresistenz entwickelten, sie waren dadurch vor exzessiver Gewichtszunahme geschützt und hatten einen erhöhten metabolischen Umsatz in der Kälte. Im Gegensatz dazu hatten Mäuse ohne LPL Expression im Skelettmuskel eine reduzierte Ansammlung von TG und eine gesteigerte Insulin Aktion bezüglich des Glucosetransports im Muskel. Das führte schließlich zu einer erhöhten Lipidaufteilung in anderen Geweben, Insulinresistenz und Adipositas. Mäuse mit fehlender LPL Aktivität im Herzmuskel entwickelten Hypertriglyceridämie und kardiale Dysfunktion. Da das Herz vermehrt auf Glukose angewiesen ist, sind freie Fettsäuren keine geeignete Energiequelle für eine optimale Funktion. Man kann aus diesen Ergebnissen ableiten, dass LPL in großem Ausmaß wichtig für einen normalen Lipidstoffwechsel ist, gewebsspezifisch Substrat liefert und auch nützt sowie mit metabolischen Fehlfunktionen und der Entwicklung von Adipositas zusammenhängt, welche von Energiebalance, Insulinstoffwechsel und Gewichtsregulation abhängt [Wang 2009].

#### **6.2.3.3 Polymorphismen LPL Gen**

Man etwa 80 Mutationen im LPL Gen gefunden, die mit der Hyperlipoproteinämie Typ 1 assoziiert werden. Wilson beschrieb 1990 einen Phänotyp, der durch Hypertriglyceridämie charakterisiert ist und erhöhte Spiegel an VLDL und niedrigere Spiegel an LDL und HDL bei Trägern der 188LPL Mutation aufweist. Studien, die die 207LPL Mutation untersuchten, fanden Veränderungen sowohl in der Konzentration als auch in der Zusammensetzung der VLDL- und LDL-Partikel, sie zeigten erhöhte TG und ApoB Spiegel.

Abgesehen von diesen eher seltenen Variationen, sind die üblichen Polymorphismen interessanter [Perez-Martinez 2008].

Talmud et al. studierte 1998 bei spanischen und afroamerikanischen Probanden die Interaktion zwischen funktionellen Varianten des LPL-93T/G Polymorphismus in der Promotorregion dieses Gens und die LPL D9N Variante. Teilnehmer, die den Haplotyp bestehend aus LPL93G Minor Allel (dieses hat mutmaßlich eine höhere transkriptionelle Aktivität) und die übliche Variante LPL9N (hier vermutet man einen Defekt in der Protein LPL Sekretion) aufwiesen, zeigten höhere Plasma TG Spiegel nach einer alimentären Fettbelastung im Unterschied zu anderen Haplotypen [Talmud 1998].

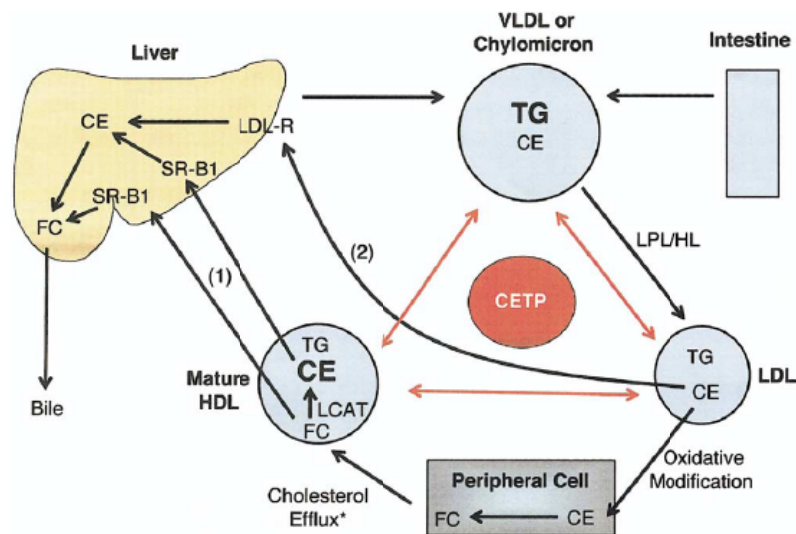
2004 analysierte Lopez Miranda den Einfluss von LPL HindIII (H1/H2) und Serin 447 Stop (S447-X) Polymorphismus in Bezug auf die interindividuelle Variabilität postprandialer Antworten. Es zeigte sich, dass die Träger des H1-Allels (Genotyp H1S-447 und H1X-447) eine niedrigere postprandiale Antwort in Bezug auf kleine triacylreiche Lipoproteine (TRL), Retinylpalmitat (RP) kleine TRL-RP und große TRL-B48 hatten, unabhängig von der basalen TG Konzentration. Der Autor schließt aus seinen Ergebnissen, dass der postprandiale Lipoproteinmetabolismus in jungen normolipämischen Männern mit LPL Polymorphismus (H1X447 Genotyp) für die niedrigere Frequenz bezüglich Erkrankung an KHK in Verbindung gebracht werden kann [Miranda 2004].

#### **6.2.4 Cholesterinesterase Transport Protein (CETP)**

CETP wird in von der Leber abgegeben und spielt eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Interaktion zwischen HDLs und der VLDL-LDL Fraktion. Es ist ein hydrophobes Plasmaglycoprotein, das hauptsächlich an HDLs gebunden zirkuliert. Es ist hauptsächlich mit der Umverteilung von Cholesterinestern (CE) und Triglyceriden zwischen Lipoproteinen beschäftigt. Da die meisten Triglyceride den VLDLs entspringen und die meisten CEs in HDL Partikel mit Hilfe der Lecithin Cholesterin Acyltransferase gebildet werden, besteht die



Aktivität des CETP in einem netto Massenaustausch von CEs von HDLs zu VLDLs und LDLs. Der Austausch zwischen HDLs und VLDLs gibt eine Erklärung für die niedrigen HDL-C Spiegel bei Patienten mit Hypertriglyceridämie. Wenn die CEs von HDLs auf VLDLs und LDLs transferiert worden sind, können LDLs für die Aufnahme durch die Leber an LDL Rezeptoren binden [Barter 2006].



**Abbildung 17:** Die Rolle des CETP beim Plasmalipid Transport

CETP befördert Cholesterylester (CE) und Triglyceride (TG) in zwei Richtungen und zwar zwischen HDL, VLD und LDL (durch rote Pfeile angezeigt.) Die meisten CEs im Plasma stammen aus HDLs durch eine Reaktion, die durch die Lecithin Cholesterin Acyltransferase (LCAT) katalysiert wird. Der Großteil der TG tritt in das Plasma als eine Komponente der triglyceridreichen Lipoproteine ein, entweder von der Leber als VLDLs sezerniert oder vom Darm in Form von Chylomikronen. VLDLs werden danach in LDLs konvertiert, nachdem ein proportionaler Anteil ihrer TG durch LPL und hepatischer Lipase (HL) hydrolysiert worden ist. Insgesamt ist der Effekt des Austauschs von CE unter diesen Lipoproteinen als netto Massentransfer von CE von antiatherogenem HDLs auf proatherogene VLDLs und LDLs zu sehen. Das Cholesterin der LDLs wird von den Zellen aufgenommen, sowohl in der Leber als auch in den peripheren Geweben, welche einen LDL Rezeptor exprimiert haben. Modifiziertes (oxidiertes) LDL wird von Makrophagen durch einen phagozytären Rezeptor mediierten Prozess aufgenommen, dadurch wird der Makrophag zur Schaumzelle. Cholesterin, sowohl in freier als auch unveresterter Form (freies Cholesterin:FC) und die veresterte Form (Cholesterinester: CE) werden zur Leber mittels HDLs zurück transportiert via Scavenger Rezeptor B1 (SR-B1) (Stoffwechselweg 1) und mittels LDLs via LDL Rezeptor (LDL-R) (Stoffwechselweg 2) [Barter 2006].

Ob die CETP Aktivität atherogen ist, bleibt Gegenstand von Diskussionen und Forschung. Verschiedene Dyslipidämien sind mit erhöhten CETP Konzentrationen verknüpft, es ist möglich, dass erhöhtes CETP das Resultat des gestörten Fettstoffwechsels ist und nicht die Ursache. Da CETP den Transfer von CE von HDLs zu VLDLs und LDLs ermöglicht, kann die Aktivität der CETP einen bedeutenden Anteil beim Rücktransport des peripheren Zellcholesterins zur Leber beitragen. Wenn man es so betrachtet, ist der Effekt der CETP antiatherogen. Andererseits, durch den Transfer von CEs von HDLs auf VLDLs und LDLs, vermindert CETP den Bestand an HDLs, das erwiesenermaßen antiatherogen gilt und erhöht die LDL-C Fraktion. Der durch CETP mediierte Austausch von CEs und Triglyceriden verändert auch die Größe und Struktur der Lipoproteinpartikel, was wiederum atherogen wirkt, da die HDL und LDL Partikel reicher an Triglyceriden werden. Diese Teilchen sind das Substrat für Triglycerid-Lipasen, welche die TG hydrolysieren und bei diesem Prozess kleine dichte LDLs und HDLs herstellen. Kleine dichte LDLs sind in größerem Ausmaß atherogen als die größeren LDL Partikel, da die Affinität zu den Proteoglykanen der arteriellen Gefäßwand höher ist, außerdem werden sie leichter vor der Aufnahme durch Makrophagen oxidiert. Nach dem heutigen Wissensstand spielt CETP eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel an verschiedenen Schlüsselstellen, sowohl mit athero- als auch antiatherogener Wirkung.

#### **6.2.4.1 Studien zu CETP**

Von Mäusen weiss man, dass sie relativ resistent gegen die Entwicklung von Atherosklerose sind, sie haben von Natur aus keine CETP Aktivität. Wenn man das CETP Gen in Mäuse einpflanzt, dann sinken die HDL-C Spiegel und sie entwickeln, induziert durch Nahrung, Atherosklerose. Im Gegensatz dazu haben Hasen eine hohe CETP Aktivität im Plasma und sind ein ideales Modell, um die Effekte zu studieren, die durch Hemmung von CETP entstehen. Injektion von Antisense Oligodeoxynukleotiden gegen CETP bei mit Cholesterin gefütterten

Hasen zeigte, dass die CETP mRNA reduziert wurde, HDL Spiegel anstiegen und die Plaquebildungen an der Aorta zurückgingen.

Man hat festgestellt, dass CETP Genmutationen in der japanischen Bevölkerung häufig vorkommen, das hat dazu beigetragen eine Verbindung zwischen herabgesetzter CETP Funktion und erhöhten HDL Spiegel herzustellen, ob dieser Effekt positiv in Bezug auf Atherosklerose gesehen werden kann, ist allerdings noch nicht geklärt [Barter 2006].

Experimente an Menschen und transgenen Mäusen haben gezeigt, dass Umweltfaktoren eine maßgebliche Rolle bei der Modulation der CETP Genexpression spielen. Bezüglich des CETP-TaqIB Polymorphismus, der sich auf die HDL-C Spiegel auswirkt, konnte festgestellt werden, dass dies nur bei männlichen Nichtrauchern zum Ausdruck kam. Bei einer finnischen Studie fand man, dass Raucher mit dem B2 Allel dazu tendierten, um 10% niedrigere HDL-C Spiegel zu haben als Träger des B1 Allels. Dieser Effekt konnte bei Frauen nicht gefunden werden, woraus geschlossen werden darf, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede gibt. In der Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Studie konnte man eine Beziehung zwischen dem CETP Polymorphismus und Alkoholkonsum feststellen. In der Framingham Studie wurden bei der Testung auf Gen-Umwelteinflüsse weder in Bezug auf Rauchen noch bei Alkoholkonsum signifikante Interaktionen gefunden. Bei dieser Studie wurden primär die Variationen am CETP Genlocus untersucht und die Aktivität der CETP in Bezug zu den HDL-C Spiegel im Plasma gesetzt. Man ging von der allgemeinen Variation am TaqIB im Intron 1 aus, untersuchte Lipoproteinspiegel und die Verteilung der Partikelgröße, die CETP Aktivität und das Risiko für KHK. Die Studienteilnehmer - 1411 männliche und 1505 weibliche - rekrutierten sich aus der Framingham Offspring Studie. Die Frequenz des B2 Allels betrug 0.444 bei den Männern und 0.433 bei den Frauen, damit war eine signifikante Erniedrigung der CETP Aktivität verbunden. B1B1 bei Männern war mit niedrigeren HDL-C Spiegel vergesellschaftet (1.07 mmol/L)

verglichen mit B1B2 Trägern(1.14 mmol/L) und solchen, die dem B2B2-Typ zugeordnet wurden.(1.18 mmol/L)

Ähnlich waren die Ergebnisse bei den weiblichen Teilnehmerinnen: B1B1 hatten niedrigere HDL-C Spiegel als B1B2 und B2B2, mit einem P von 0,001. Bei den Männern wurde das B2 Allel mit einer vergrößerten Partikelgröße für HDL und LDL in Zusammenhang gebracht, bei Frauen war dies nur bei HDL festzustellen. Die Odds Ratio für das Vorhandensein von CVD war bei Männern mit dem B2 Allel 0.696 (P50.035) Nach Anpassung für die Parameter BMI, Blutdruck, Diabetes, Rauchen, Beta Blocker Medikation, Cholesterin gesamt und HDL-C Spiegel war die Odds Ratio 0.735 (P50.187), was die Annahme zuließ, dass der protektive Effekt teilweise in Verbindung zuden HDL-C Werten stand. Bei Frauen wurden keine signifikanten Werte für einen schützenden Effekt gefunden. Diese Daten zeigen, dass die Variationen am CETP-Genlocus eine signifikante Determinante für die HDL-C Spiegel sind, ebenso für die CETP Aktivität und die Lipoproteingröße, was die Population dieser Studienteilnehmer betrifft. Bei Männern mit dem B2 Allel zeigte dies einen gewissen Schutz bezüglich CVD [Ordovas 2000].

Bezüglich CETP und dem Zusammenhang mit CVD gibt es unzählige weitere Studien, die keine eindeutigen Ergebnisse gebracht haben.

Mit der „Cholesterol and Recurrent Events“ (CARE) Kohorte wurde eine prospektive Analyse des CETP TaqIB Polymorphismus in Bezug auf CVD und Interaktion mit Cholesterin senkender Therapie gemacht. Die Care Studie war so ausgelegt worden, dass man den Effekt eines Cholesterinsenkers auf koronare Ereignisse über fünf Jahre beurteilen konnte. Mit Hilfe von quantitativen Ergebnissen der Koronarangiographien der Teilnehmer sollte an Hand des CETP TagIB Gen Polymorphismus die Progression der Koronarsklerose als Antwort auf die Statintherapie ausgewertet werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass der CETP TagIB Polymorphismus weder kardiovaskuläre

Ereignisvorhersagen zuließ noch aufzeigte, ob die Patienten durch die Statintherapie einen Vorteil hätten [De Grooth 2004].

### **6.2.5 Neue Genloci, die Lipidspiegel und CVD beeinflussen**

Das Ziel dieser in „Nature.Genetics“ veröffentlichten Studie war Genloci zu finden, welche die zirkulierenden Lipidspiegel regulieren, um das kardiovaskuläre Risiko sowohl durch Nahrungsumstellung oder Statintherapie zu senken. Es war die erste GWA Studie, bei der über Loci, die das Gesamtcholesterin, LDL-C, HDL-C und Triglyceride betreffen, berichtet wird. Die Proben waren aus 16 populationsbasierenden Kohorten genommen und mit der Illumina HumanHap300-Duo Plattform genotypisiert. Die Studienteilnehmer (17,797-22,562 Personen, abhängig von der gewählten Lipiduntersuchung) waren zwischen 18 und 104 Jahren alt, sie stammten aus europäischen Regionen vom Norden bis zum Süden. Es wurden 22 Genloci festgesetzt, die mit Serumlipidspiegel assoziiert werden, 16 davon waren schon in früheren Studien identifiziert worden. Die sechs neuen Loci, die aus den Kohortenproben identifiziert wurden waren: ABCG5 (TC,  $P = 1.5 \times 10^{-11}$ ; LDL,  $P = 2.6 \times 10^{-10}$ ), TMEM57 (TC,  $P = 5.4 \times 10^{-10}$ ), CTCF-PRMT8 Region (HDL,  $P = 8.3 \times 10^{-16}$ ), DNAH11 (LDL,  $P = 6.1 \times 10^{-9}$ ), FADS3-FADS2 (TC,  $P = 1.5 \times 10^{-10}$ ; LDL,  $P = 4.4 \times 10^{-13}$ ) und MADDFOH1 Region (HDL,  $P = 6 \times 10^{-11}$ ). Bei drei der Loci konnten geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Der genetische Risiko Score basierend auf den Lipidloci erklärte 4,8% der Lipidvariationen und konnte mit einer Intima-Media-Verdickung der Arteria Carotis ( $P = 0.001$ ) und der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit ( $P = 0.04$ ) in Verbindung gebracht werden. Dieser genetische Risiko Score verbessert die Screening-Methoden für Risikogruppen der Dyslipidämie gegenüber klassischen Risikofaktoren [Aulchenko 2009].

### 6.2.6 Genexpression durch Olivenöl

In einer 2008 veröffentlichten explorativen nutrigenomischen Studie wurde die Antwort von peripheren mononuklearen Zellen im Blut (PBMNCs) auf die Aufnahme von Olivenöl (VOO) überprüft, um die antiatherogene Wirkung des Öls auf die Gefäßwand zu untersuchen. Es wurden Genexpressionsprofile von PBMNCs bei gesunden jungen Erwachsenen gemacht, die über drei Wochen eine standardisierte Diät mit einer durchschnittlichen Menge an VOO (es war das alleinige Fett auf dem täglichen Speiseplan) unter Restriktion von Phenolen und Antioxidantien, zu sich nahmen. Nach Ende der Studienzeit wurde die Antwort von 10 Genen (ADAM17, ALDH1A1, BIRC1, ERCC5, LIAS, OGT, PPARBP, TNFSF10, USP48, und XRCC5) mit qPCR gemessen. Sie waren vermehrt exprimiert worden [Khymenets 2008].

Diese Studie hatte nur wenige Teilnehmer, sie ist dennoch interessant, wenn man einen Beweis dafür sucht, wie Nahrungsmittel auf molekularer Ebene den Stoffwechsel beeinflussen und somit auf die Atherosklerose Einfluss nehmen können.

## 6.3 B-Vitamine, Homocystein und CVD

Es gibt viele prospektive und retrospektive Fall-Kontrollstudien, die zu beweisen versucht haben, dass erhöhte Plasmahomocysteinspiegel mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko einhergehen. Metaanalysen dieser Studien ergaben, dass die Senkung von erhöhten Homocysteinspiegeln um 3mol/L (oder 25% von einem Durchschnitt von 12 mol/L) das Risiko von CVD erniedrigen, 11-16% bei KHK und Insult um 24,2%. Hcy Spiegel sind genetisch als auch ernährungsbedingt bestimmt [McNulty 2006]. Die Inzidenz der Hyperhomocysteinämie variiert unter den ethnischen Gruppen und hängt mit dem Alter, dem Geschlecht, den Lebensgewohnheiten wie Rauchen, Alkohol, Kaffee, dem Gebrauch von Vitaminpräparaten zusammen. [Malinowska 2009]. Folat, das wegen Fortifikation sehr diskutiert wird, ist eine wichtige Determinante für das

Hcy und unter bestimmten Umständen kann Folat Hcy Spiegel senken. Auch Vitamin B6 und B12 spielen Schlüsselrollen im Hcy Metabolismus, beide zeigen Wirkung bei Substitution, vor allem wenn der Folatstatus optimiert wurde [McNulty 2006].

### 6.3.1 Folsäure

1931 wurde von Lucy Wills mit Hefeextrakt die topische makrozytäre Anämie bei Schwangeren erfolgreich behandelt. Der maßgebliche Faktor dafür war die Folsäure, die Isolierung dieses Vitamins und die Strukturformel wurde von verschiedenen Wissenschaftlern in den Jahren danach erreicht. Der Name leitet sich vom lateinischen Wort „Folium“ (Blatt) ab. Die chemische Struktur des Pteroylpolyglutamat besteht aus einem Pteridinkern, p-Aminobenzoesäure und L-Glutamat. In der Nahrung kommen verschiedene Formen vor, die sich in der Anzahl der Glutamylreste, die am Pteridin-p-Aminobenzoesäurekomplex angeheftet sind, unterscheiden. Die biologisch aktive Form ist die Tetrahydrofolsäure (THF), sie entsteht durch Reduktion mit Hilfe der Folatreduktase zu Dihydrofolsäure und anschließend zu Tetrahydrofolsäure. Die biochemische Funktion der THF ist die Übertragung von C1-Gruppen als Coenzym, die Träger für die C1-Gruppen sind die N-Atome in Position 5 und 10 am Pteroylrest.

In den letzten Jahrzehnten hat das Interesse an der Folsäure auf Grund der positiven Wirkung auf die Gesundheit stark zugenommen. Bezüglich der CVD ist der Zusammenhang von Folsäure und Homozystein (HCY) wichtig, die mögliche positive Wirkung gegen okklusive Gefäßerkrankungen. Die meisten Funktionsstörungen können wahrscheinlich auf:

- Ein oder mehrere Genpolymorphismen im HCY Remethylierungsprozess, welche die zelluläre Folatdisposition verändern
- Niedrige Aufnahme von Folat

- Beeinträchtigte DNA Bildung und/oder Genexpression, die mit dem Folat Metabolismus verbunden sind

Möglich sind auch Kombinationen dieser Faktoren oder noch nicht entdeckte Genmutationen.

Hyperhomocysteinämie wird als Risikofaktor für cerebrovaskuläre, periphere und koronare Gefäßerkrankungen gewertet. Sie betrifft in ihrer schädigenden Wirkung Arterien und Venen. Erhöhte Spiegel können durch genetische oder ernährungsbedingte Störungen verursacht sein, sie betreffen die Sulfonierungs- oder Remethylierungswege im Homocysteinmetabolismus. 5,10-Methylenetetrahydrofolat Reduktase (MTHFR) katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylenetetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat, die vorherrschende zirkulierende Form des Folats und der C1-Donator für die Remethylierung des Homocysteins zu Methionin. Reduzierte Aktivität der MTHFR Aktivität, da es thermolabile Eigenschaften aufweist, wurde bei Patienten mit koronarer- sowie peripherer arterieller Erkrankung der Gefäße berichtet. Die Ursache liegt in einer häufig vorkommenden Mutation im MTHFR Gen. Die Thermolabilität wird durch den Aminosäureaustausch Alanin gegen Valin an der Position 677 bewirkt. Diese Variation kommt in etwa 38% von unselektierten Chromosomen vor. Die Mutation - sowohl bei Homozygotie als auch Heterozygotie - zeigt eine reduzierte Enzymaktivität und gesteigerte Thermolabilität in den Extrakten von Lymphozyten. Bei Patienten, wo diese Veränderung homozygot vorliegt, findet man signifikant erhöhte Homocysteinspiegel [Lucock 2000].

Erhöhte Plasmawerte von HCY werden als Risikofaktor für vaskuläre Erkrankungen gesehen. Erhöhte HCY Spiegel können mit Substitution von Folsäure gesenkt werden, die individuelle Antwort auf solch eine Therapie ist allerdings unterschiedlich. In einer Studie an 142 koronarkranken Patienten und einer Vergleichsgruppe von 102 Teilnehmern wurden sechs genetische Polymorphismen in drei HCY metabolisierenden Genen bestimmt und die Beziehung zur Inzidenz von KHK, HCY Spiegel und das Senken von HCY



The diagram illustrates the biochemical pathways of methylation and transsulfuration. It begins with Folic acid, which is converted to THF. THF can be converted to Methylene-THF, which is then converted to Methyl-THF by the enzyme MTHFR. Folate is also converted to Methyl-THF. Methyl-THF is used in the Methylation pathway, which involves the conversion of Vit. B<sub>12</sub> Cob. I to Vit. B<sub>12</sub> Cob. II. This pathway is labeled MSR. The Methylation pathway also involves the conversion of Met to SAM, which is then converted to SAH. SAM is used in Methylation reactions, releasing CH<sub>3</sub>. SAH is converted to Hcy. Hcy is converted to Homocysteine thiolactone. The Transsulfuration pathway involves the conversion of Hcy to Cystathionine by the enzyme CBS, which uses Vit. B<sub>6</sub>. Cystathionine is then converted to Cys by the enzyme CBS, which also uses Vit. B<sub>6</sub>. The Transsulfuration pathway is labeled CBS.

Cob, Cobalamin; Cys, Cysteine; Met, Methionin [Malinowska 2009].

699T Homozygote zeigten eine Senkung des Hcy Spiegels um 13,6% verglichen zu einer Senkung von 4,8% bei 699C Homozygoten ( $P = 0.009$ ), bei 1080C Homozygoten kam es zu einer Senkung der Hcy Spiegel um 12,9% verglichen zu 2,7% zu den 1080T Homozygoten ( $P = 0,005$ ). Diese zwei Polymorphismen sind Änderungen im dritten Kodon und man hätte nicht voraussagen können, ob sie das kodierte Protein verändern hätten. Da zwischen diesen beiden Positionen ein starkes LD besteht, kann man annehmen, dass sie auch mit anderen, derzeit noch

nicht identifizierten Polymorphismen verknüpft sind, die im CBS Gen auftreten. Man kann aus der Studie schließen, dass gewisse Polymorphismen die Suszeptibilität für KHK und Gefäßerkrankungen fördern, außerdem sagt der genetische Code voraus, ob eine Substitutionstherapie mit Folat eine Verbesserung bringt [Warren 2000].

In einer 2009 durchgeführten Studie, welche die Teilnehmer aus der CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) rekrutierte, wurden die Serum von 997 Kaukasiern und 692 Afroamerikanern auf totalen Hcy (tHcy) Spiegel vor und nach Folatsubstitution bestimmt. Genotypisierung erfolgte für Varianten in vier Genen, die mit dem Hcy Metabolismus zusammenhängen:

- Cystathionin b-Synthase (CBS) 844ins68
- Methionin Synthase (MS) 2756A>G
- Methionin Synthase Reductase (MTRR) 66A>G
- Methylenetetrahydrofolat Reductase (MTHFR) 677C>T und 1298A>C

Eine größere Anzahl von Afroamerikanern waren homozygot für die MS 2756GG, MTRR 66GG und CBS 844ins68 Genotypen, wenn man sie mit den Kaukasiern verglich, während die Prävalenz für MTHFR 677TT und 1298CC Genotypen bei Afroamerikanern weniger oft vorkam als bei Kaukasiern.

Bei Kaukasiern und Afroamerikanern, die homozygot für MTHFR 677T waren, sah man vor und nach Folatfortifikation erhöhte Plasma Hcy Spiegel verglichen mit jenen, die den 677CC/677CT Genotyp trugen, allerdings hatten sich die Unterschiede nach der Substitution mit Folat aneinander angeglichen.

Die Prävalenz einer milden Hyperhomocystinämie bei MTHFR 677TT Homozygoten wurde durch Folatsubstitution um 25% gesenkt. Die kombinierte Assoziation von MTHFR 677C>T und 1298A>C, MS 2756A>G, MTRR 66A>C und CBS 844ins68 mit HCY Konzentrationen vor und nach Folatfortifikation zeigte, dass nach Folatgabe die signifikante Assoziation zwischen MTHFR 677C>T und tHcy bei Kaukasiern sank und bei Afroamerikanern zum

Verschwinden kam, wiewohl zu bemerken ist, dass die Anzahl letzterer sehr gering war [Tsai 2009].

### 6.3.2 Riboflavin (B2)

Zu Riboflavin wurde 2006 eine interessante Studie veröffentlicht. Menschen, die homozygot für den Methylenetetrahydrofolat Reduktase (MTHFR) 677C3T Polymorphismus sind, haben eine verminderte Aktivität des MTHFR Enzyms, das auf den Verlust des B2 Vitamins als Kofaktor durch diesen Polymorphismus zurückzuführen ist. Ob durch Substitution von Vitamin B2 die für diese Genvariation tragenden Menschen typisch erhöhten Hcy Spiegel gesenkt werden könnten, war Gegenstand der Studie, welche diese Frage teilweise positiv beantworten konnte. Die Studienteilnehmer (680) waren zwischen 18 und 65 Jahren alt, durchwegs gesund und trugen den MTHFR 677C3T Genotyp, 38 aus der Gruppe waren homozygot für den TT Genotyp und ihre Ergebnisse wurden mit Menschen, die den heterozygoten CT - (n 26) oder wild-type Genotyp CC (n 28) trugen, verglichen. Die Teilnehmer wurden in Gruppen eingeteilt und erhielten entweder 1,6 mg/die Vitamin B2 oder ein Placebo für eine Zeitspanne von 12 Wochen. Bei allen wurde ein verbesserter Riboflavinstatus in gleichem Ausmaß gemessen, eine Antwort in Bezug auf Hcy konnte nur in der TT Genotyp Gruppe gesehen werden, die Hcy Spiegel sanken um etwa 22%, bei jenen, die einen erniedrigten Hcy Spiegel vor dem Versuch hatten, um 44%. Es war erstaunlich, dass in der CC oder CT Genotypgruppe keine Reaktion des HCY Spiegels zu messen war, obgleich diese Teilnehmer einen primär erniedrigten Riboflavinspiegel hatten.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Träger des MTHFR 677 TT Genotyps ein höheres Risiko haben, an CVD zu erkranken, wobei dies nur für Europa gilt, da in den Vereinigten Staaten seit 50 Jahren Riboflavin fortifizierte Nahrung angeboten wird [McNulty 2006].

Der Mechanismus der Interaktion der Polymorphismen von Genen, die den Hcy Stoffwechsel beeinflussen, der Hyperhomocysteinämie, Risiko für CVD und die individuelle Antwort des Einzelnen auf Ernährungstherapie ist noch nicht geklärt.

Exemplarische Versuche der Vitaminsubstitution mittels Ernährung – Folsäure als singuläre Substitution aber auch in Kombination mit Vitamin B12 (Kofaktoren für HCY Methylierung oder Sulfonierung) sowie Vitamin B6 – um die Homocysteinspiegel zu senken und das Risiko für CVD zu mindern, haben Resultate ergeben, die sich gegenseitig widersprechen, was mit den oben erwähnten Polymorphismen zu erklären ist. Versuche mit Substitution von B6 und B12 ohne Folsäure beeinflussen durchgehend die HCY Spiegel nicht in dem Ausmaß wie in Kombination mit diesen. Studien, die mittels kombinierter Vitaminsubstitution den Zustand von CVD erkrankten Patienten verbessern wollten, zeigten das gewünschte Ergebnis nicht.

In Bezug auf Patienten, die genetisch die Cystathionine  $\beta$  – Synthase (CBS) - 21q22.3 mangelhaft angelegt haben, ist die Vitaminsubstitution mit Folsäure, Vitamin B6 und einer methioninarmen Diät erforderlich, da sie Gefahr laufen, Opfer des sogenannten „Sudden Death“ durch vaskuläre Komplikationen zu werden.

Bei Patienten, die an einem MTHFR Enzymdefekt leiden, muss Betain zugeführt werden, dadurch wird die HCY Remethylierung durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase verbessert [Malinowska 2009].

## **6.4 Phytochemikalien und CVD**

### **6.4.1 Polyphenole, Flavonoide**

Flavonoide sind Pflanzenpigmente, die aus Phenylalanin synthetisiert werden, sie emittieren Fluoreszenz, wenn sie von UV Licht angeregt werden und kommen überall in grünen Pflanzenzellen vor. Sie regulieren unter anderem das

Wachstum der Pflanzen durch Verhinderung der Exocytose, die von Auxin (Pflanzenhormon) gesteuert wird, weiters beeinflussen sie auch die Induktion der Genexpression. Sie hemmen wichtige virale Enzyme wie die reverse Transkriptase und Protease, sie können Bakterien und auch einige Protozoen zerstören. Ihre Toxizität für Tierzellen ist gering. Unsere tägliche Aufnahme mittels Gemüse und Früchten beläuft sich etwa auf 1-2 g. Flavonoide sind für die Medizin wichtig, da die Inhibition gewisser Enzyme nachgewiesen ist, sie haben die Fähigkeit die Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern zu simulieren und sind als Radikalfänger bekannt [Havsteen 2002].

Die Aufnahme von Polyphenolen über Früchte, Gemüse und Getränke (Tee, Kakao, Rotwein) hält man für günstig in Bezug auf den Schutz vor CVD. Es gibt epidemiologische Studien, die zeigen, dass eine inverse Beziehung der Aufnahme von Polyphenolen zum Risiko der CVD besteht. Die möglichen Ursachen der Protektion sieht man in der Wirkung der Polyphenole auf das Endothel der Gefäßwand, die Hemmung der Angiogenese, der Zellproliferation und Zellmigration. In Studien konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Phenole die Produktion von EDHF und Prostacyclin vermehren und die Vasokonstriktion über Endothelin1 in den Endothelzellen vermindern. Außerdem wird die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VGEF) und die Matrix Metalloproteinase-2<sup>26</sup> in den glatten Muskelzellen gehemmt.

Auf Grund unseres derzeitigen Wissens nimmt man an, dass diese Mechanismen durch Polyphenole getriggert werden, verschiedene Polyphenole induzieren verschiedene Mechanismen, die letztlich alle zum vasoprotektiven Geschehen beitragen, die bisher in Zell-, Tier und Studien mit Menschen festgestellt worden sind [Stoclet 2004].

Neben der positiven Wirkung auf die Gefäßwand, werden den Polyphenolen auch antiinflammatorische Wirkung und positiver Einfluss auf die

---

<sup>26</sup> eine Enzymklasse, welche sich durch ein im aktiven Zentrum lokalisiertes Zink-Ion auszeichnet. Physiologische Prozesse: Auf- und Abbaureaktionen von Bestandteilen der Zellmembran oder des sie umgebenden Matrixgewebes; [<http://bieson.ub.uni-bielefeld.de> (19.01.2010)]

gerinnungshemmende Wirkung der Thrombozyten zugesprochen. Epidemiologische Studien bezüglich dieser Wirkstoffgruppe haben widersprüchliche Aussagen, eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass Studien teilweise in Populationen durchgeführt worden sind, wo die Studienteilnehmer bereits mit der täglichen Nahrung – wie etwa bei den Engländern der hohe Teekonsum - eine Sättigung an dieser Wirkstoffgruppe erreicht haben und durch weitere Anreicherung der Nahrung kein zusätzlich positiver Effekt gefunden werden konnte [Vita 2005].

Bezüglich der antithrombotischen Wirkung der Polyphenole ist eine interessante Arbeit erschienen, die 25 kontrollierte Interventionsstudien an Menschen untersuchte, welche die Wirkung der sekundären Pflanzenmetabolite überprüften. Man stellte eine große Variation der Studiendesigns fest, der Art der Forschung und der Studiensubjekte, was wieder in kontroversen Schlussfolgerungen gipfelte. Neben der Frage, ob durch die tägliche Zufuhr von Obst und Gemüse sowie polyphenolhaltigen Getränken in derzeit empfohlenen Mengen eine ausreichender Wirkspiegel erreicht werden kann, um die protektive Wirkung zu entfalten, bleibt auch das Wissen, welche Wirkstoffe dieser Gruppe besonders günstig sind, offen. Eine Aussage, die überall gleich positiv beantwortet wurde, war die Tatsache, dass kakaohältige Produkte in mäßigen Mengen einen positiven Einfluss auf die antithrombotische Wirkung ausüben. Der Autor ist der Ansicht, dass es mehr gut kontrollierte Studien in der Zukunft geben müsste, um die Wirkung von anderen Polyphenolklassen oder deren Metabolite zu finden, die zeigen, dass Thrombozytenaggregationen gehemmt werden [Ostertag 2010].

Bezüglich der hormonsimulierenden Wirkung von Polyphenolen gibt es eine Studie, die Polyphenole in Rotwein (RWP) untersuchte. Östrogene stimulieren die Bildung von NO, Polyphenole haben phytoöstrogene Eigenschaften. Es wurden isolierte Ringe der Aorta von Ratten und gezüchtete Endothelzellen mit RWPs versetzt, man fand heraus, dass die Östrogenrezeptoren die phytoöstrogene Wirkung der RWPs weiterleiteten, das resultierte in einer vom

Endothel abhängigen Relaxation, wobei dieser Effekt bei den Proben von weiblichen Tieren ausgeprägter war als bei männlichen. Es konnte auch festgestellt werden, dass RWPs zusätzlich über die redox sensitive PI3-Kinase/Akt<sup>27</sup> eine NO medierte Relaxation bewirkten, was in diesem Fall nicht über die Östrogenrezeptoren läuft, trotzdem bei weiblichen Tieren stärker ausgeprägt war [Kane 2009].

## **6.5 Antioxidantien**

### **6.5.1 Der Begriff Antioxidans**

Freie Radikale sind elektrisch geladene Moleküle, welche nach Elektronen suchen oder sie von anderen Substanzen einfangen, um sich selbst zu neutralisieren. Dadurch wird ein anderes Radikal geschaffen, es kommt zu einer Kettenreaktion. Bis zu dem Zeitpunkt, wo nachfolgende freie Radikale deaktiviert wurden, können innerhalb von Sekunden tausende von Reaktionen der freien Radikale geschehen sein.

Der Terminus Antioxidans bezieht sich auf jedes Molekül, das die Möglichkeit besitzt, freie Radikale zu stabilisieren oder zu deaktivieren, bevor sie andere Zellen attackiert haben. Dazu gehören speziell die primären Antioxidantien (AO). Es gibt auch Moleküle, die den Begriff AO verdienen, weil sie durch Bindung an Metalle chelatbildende Substanzen sind (Redox Aktivität).

Um den menschlichen Körper vor freien Radikalen zu schützen, gibt es ein sehr komplexes antioxidativ wirksames Schutzsystem, das aus endogenen und exogenen Komponenten besteht, welches interaktiv und synergistisch arbeitet, um freie Radikale zu neutralisieren. Mit der Nahrung werden Vitamin C, Vitamin E, Carotinoide, Polyphenole und niedrig molekulare Stoffe wie Liponsäuren aufgenommen. Jene Nahrungskomponenten, die nicht selbst freie Radikale

---

<sup>27</sup> Phosphoinositid 3 Kinasen, Akt steht für Protein Kinase B (Shimamura, J Am Soc Nephrol 14:1427-1434, 2003)

neutralisieren, bewirken eine Verbesserung der endogenen antioxidativen Vorgänge.

Wenn es durch exogene Lebensbeeinflüsse zu vermehrtem oxidativem Stress kommt, dann reichen diese Selbstschutzmechanismen des Körpers nicht aus, die Radikale abzufangen.

### **6.5.2 Antioxidantien aus der Nahrung**

Auf Grund der „Oxidationstheorie“ im Rahmen der Artherosklerose, sind Antioxidantien, die man mittels Nahrungszufuhr aufnimmt, interessant geworden, um sie präventiv oder therapeutisch einzusetzen.

Es gibt genügend positive Hinweise aus Observations-, in vitro-, ex vivo- und kontrollierten Interventionsstudien, auch an Tiermodellen, die bestätigen, dass durch die Aufnahme gewisser Nahrungsstoffe der oxidative Stress reduziert wird, ebenso die BM für Myokardinfarkt. Am meisten wurden Vitamin E, Vitamin C, Carotinoide und Polyphenole (wie nachfolgend beschrieben) untersucht.

Es gibt eine Anzahl von Beobachtungsstudien (epidemiologische, Fall-Kontroll, prospektiv, retrospektiv) die eine Verbindung von Vitamin C und E zur Prävention von CVD herstellen (diese sind aus Tabelle 11 zu entnehmen).

Die Studien ergeben zwar interessante Resultate, da aber bei den Observationsstudien die Aufnahme von Mikronährstoffen über Recall Fragebögen erstellt worden sind, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht präzise sind. Es werden Hypothesen auf Grund von Korrelationen aufgestellt, es wird aber der zugrunde liegende Mechanismus nicht geklärt. Es ist daher notwendig, kontrollierte Interventionsstudien, ex vivo und in Tiermodellen durchzuführen, um die Hypothesen zu belegen [Kalliora 2006].

Andere Ursachen für die Widersprüchlichkeit der Studien: – betrachtet man Vitamin E – wären:



- Die genetische Variabilität der Lipoproteine, die Vitamin E im Blut transportieren. Dadurch wären zum Teil der interindividuelle Bedarf und die Homöostase für Vitamin E zu erklären. Es ist bekannt, dass ApoA-IV die Plasmspiegel von Vitamin E und den Carotinoiden beeinflusst.
- Die Interaktion mit anderen Nährstoffen (Antioxidantien), die bei der Ernährung zusammen vorkommen.
- Die Notwendigkeit, die physiologischen Konzentrationen und die Dauer der Einnahme von Vitamin E.
- Es gibt keine Tiermodelle, die perfekt die menschliche Atherosklerose widerspiegeln.
- Die Studien werden zum Teil an Menschen durchgeführt, die ein relativ spätes Stadium der Atherosklerose haben [Nakamura 2009].

Das heutige Wissen über die molekulare Wirkung von Vitamin E und C wurde daher an Zellkulturen in vitro und in experimentellen Tiermodellen gefunden [Kaliora 2006].

<b>Anitoxidantien</b>	<b>Effekte</b>		
	In vitro	Ex vivo	In vivo
<b>Vitamin E</b>	Inhibition der LDL oxidation	Erhöhung des oxidativen Widerstands von LDL	Niedrigeres Risiko für MI, Chaos Studie
	Verminderung der Protein-Kinase-C (PKC) Aktivität	Herabsetzung der Agonisten induzierten Plättchen-aggregation	Erhöhung der Autoantikörper gegen oxLDL
	Verminderung der SRA und CD36 Expression	Induktion der Plättchen Sensitivität zur PGE Inhibition	Senkung der Plasma MDA Spiegel (Malondialdehyd)
	Verminderung von Kollagen $\alpha 1$ und GlykoproteinIIb RNA	Verminderung der ATP Sekretion durch stimulierte Plättchen	Verminderung der Konzentration von $\beta$ -Thromboglobulin Konzentrationen im Plasma
	Verminderung der IL-4 Gen Expression	Verhinderung der PKC medierten endothelfunktion	Verminderung von ICAM-1 und VCAM-1 Expression in der Aorta
	Verminderung der IL-1 $\beta$ Gen Expression		Verminderung der Makrophagenanhäufung und Senkung der Läsionen in der Aorta
	Verminderung der CD 95 Liganden Expression		

	In vitro	Ex vivo	In vivo
<b>Vitamin C</b>	Inhibition der LDL Oxidation	Anstieg des Widerstandes der LDL Oxidation	Minderung der Wandstärke der A.carotis, ARIC Studie
	Verminderung der Transkription von Elastin	Verminderung der Agonisten induzierten Plättchenaggregation	Niedrigeres Risiko für MI, Kuipo Atherosclerosis Studie
	Verminderung von ICAM-1 Expression		Herabsetzung der arteriellen Steifheit
	Erhöhung der Bcl-2 Gen Expression		Modulation der Flow-mediated Dilatation
	Verminderung der VEGF Expression		Verhinderung der Kollagen Ablagerung und Reifung der Plaques
			Normalisierung der genexpression von antioxidativen Enzymen
			Minderung der Expression von iNOS
			Minderung der ICAM-1 mRNA Expression

**Tabelle 11:** der Effekt von Vitamin E und C in vitro, ex vivo und in vivo antioxidativen Wirkung [Kaliyora 2006].

### 6.5.3 Vitamin E

Vitamin E ist eine endogene redox-aktive Komponente der zirkulierenden Lipoproteine und (sub)zellulären Membranen, der Spiegel dieses Vitamins kann durch exogene Zufuhr verändert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Vitamin E gewisse Prozesse, die mit Atherosklerose verbunden sind, beeinflussen kann. Dies bezieht sich wie oben erwähnt auf Zellkultur und Tiermodellstudien [Neuzil 2001].

Vitamin E hat eine definierte Rolle als Antioxidans. Neuere Studien zeigen, dass es auch regulierend auf Gen/Protein Expression wirkt und Enzyme hemmt. Vitamin E könnte seine Rolle als Antioxidans sowohl direkt als auch über die inhibitorische Wirkung auf die Aktivität und Expression von ROS (reaktive Sauerstoffradikale) generierenden Enzymen ausüben. Es ist allerdings zu beachten, dass diese Wirkungen von der Menge des Vitamins als auch der Anwesenheit von Oxidantien/Antioxidantien bestimmt werden [Nakamura 2009].

An kultivierten menschlichen aortalen glatten Muskelzellen wurde mittels  $\alpha$ -Tocopherol (die aktivste Form von Vitamin E) in einer physiologischen Konzentration, die frühesten Ereignisse in der Kaskade der fortschreitenden Atherosklerose, die Aufnahme von oxidiertem LDL und die Schaumzellbildung dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der CD36 Scavenger Rezeptor (das ist ein spezifischer Rezeptor für oxidiertes LDL) durch  $\alpha$  Tocopherol hinunter reguliert werden konnte, sowohl die mRNA als auch das Protein. Dadurch kam es zu einer verminderten Aufnahme von oxidiertem LDL, in weiterer Folge reduzierte  $\alpha$ -Tocopherol dadurch die Bildung von Schaumzellen [Ricciarelli 2000].

Es gibt zwei größere redox-sensitive Stoffwechselwege, die mit atherogenen, carcinogenen und inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden; PPAR $\gamma$ - und NF- $\kappa$ B/p50/p65-medierte Stoffwechselwege.

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind intrazelluläre Rezeptoren, die nach Bindung eines Liganden die Gentranskription aktivieren. Sie gehören zur Suprfamilie der Steroidhormonrezeptoren. Es gibt drei Isoformen: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  und PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  werden in den vaskulären Endothelzellen, in den glatten Muskelzellen und im Fettgewebe exprimiert, PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  spielen eine Rolle im Entzündungsgeschehen, bei der Adipogenese und Insulinsensibilisierung. Synthetische PPAR $\gamma$  Aktivatoren, wie etwa Troglitazon, haben Auswirkungen auf die Adipozytendifferenzierung, und auf das Entzündungsgeschehen, (antiinflammatorisch)gezeigt, sie haben eine antidiabetische und antiatherogene Komponente. Neuere Studien weisen darauf hin, dass Tocopherole auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit diesem synthetischen PPAR Aktivator auf Grund von Stimulierung des PPAR $\gamma$  als Genregulatoren wirksam sind.

NF- $\kappa$ B ist ein anderer redox-sensitiver Transskriptionsfaktor, der in allen Zelltypen exprimiert wird. NF- $\kappa$ B bindet an spezifische DNA Sequenzen, (50-GGGRNNYYCC-30) die NF $\kappa$ B Aktivierung wird von intra und extrazellulären

ROS und/oder ROS modifizierte Zielmolekülen gesteuert, NF- $\kappa$ B ist in die Regulierung von Immun und Entzündungsreaktionen involviert. Es sind zwei Formen von NF- $\kappa$ B erforscht worden, das NF- $\kappa$ B p50/p65 Heterodimer und das NF- $\kappa$ Bp50 Homodimer, beide spielen eine Rolle bei der Regulierung von inflammatorischen Genprozessen, wobei man vermutet, dass sie antagonistisch wirken, NF- $\kappa$ B p50/p65 induziert proinflammatorische Aktionen, NF- $\kappa$ Bp50 hemmt diese. Die Untereinheit der DNA Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ Bp50 wird von reduzierenden Agenten stimuliert, dazu wird auch  $\alpha$  Tocopherol gezählt. Trotzdem hat die Verbindung von NF- $\kappa$ B und Vitamin E einen spekulativen Charakter; da die Entzündung bei der Entstehung der Atherosklerose eine grundlegende Rolle spielt, soll hier folgende Tierstudie erwähnt werden:

Man hat Mäuse, denen das Tocopherol Transfer Protein fehlte, Zigarettenrauch ausgesetzt und dabei mehr als 2000 Gene gefunden, die durch ein Tocopherol im Lungengewebe moduliert wurden. Die Gene, die identifiziert worden waren, beinhalteten immun-inflammatorische Gene, welche durch den NF- $\kappa$ B Signalweg reguliert werden. Der inhibitorische Effekt von Vitamin E auf die NF- $\kappa$ Bp50/p65 Aktivierung, wurde schon in früheren Studien gesehen. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob diese Wirkung von Vitamin E auf Grund von herabgesetztem oxidativen Stress und/oder auf die nicht antioxidativen Funktionen von Vitamin E zurückzuführen sind [Nakamura 2009].

#### **6.5.4 Vitamin C**

Für dieses antioxidativ wirksame Vitamin gibt es viele Studien, die auf den potentiellen positiven Effekt von Vitamin C bei der Genregulation in Bezug auf Atherosklerose hinweisen. Auch für dieses Vitamin gibt es keinen Beweis der positiven antioxidativen Wirkung in Bezug auf CVD. Es gibt kleinere Studien, in denen Vitamin C in Kombination mit Vitamin E positive Effekte zeigt:

- „Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention study“, hier wurde an Hand der Carotis Intima Messung die Progression der Artherosklerose innerhalb von drei Jahren gemessen
- „Intravascular Ultrasonography Study“, bei der der Effekt von Vitamin E und C auf die Progression der Artherosklerose bei Herz transplantierten Patienten bestimmt wurde, insoweit interessant, da auf Grund der Transplantation vermehrt oxidativer Stress produziert wird und dies zu einer rascheren Progression der Atherosklerose führen kann. Diese Studie wurde 2002 im „Lancet“ veröffentlicht.

Um die Frage der positiven Wirkung von Antioxidantien zu erschweren, wurden auch Studien mit einem negativen Ausgang veröffentlicht:

In der „the Women’s Angiographic Vitamin and Estrogen Study“ wurde zusätzlich zu einer Östrogensubstitutionstherapie Vitamin E und C verabreicht, was zur Folge hatte, dass die Gruppe, die an Stelle von Vitaminen Placebo erhalten hatten, bessere Resultate aufwiesen [Kris-Etherton 2004].

Unter normalen Bedingungen ist der Gehalt an Vitamin C im Plasma relativ niedrig. Cytochrom P450 ist ein Schlüsselenzym, das die Detoxifikation der durch Zigaretten Rauchen entstehenden Toxine katabolisiert, dies ist für die durch Rauchen induzierte Atherogenese wichtig. Hier fördert Vitamin C die Detoxifikation, indem es die CYP1A1<sup>28</sup> Gen Expression herabsetzt.

Vitamin C greift auch in den Stoffwechselweg der PPARs ein, indem es die Genexpression der CUZNSOD (Kupfer-Superoxid-Dismutase), der MNSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase) und der Katalase (Gene für antioxidative Enzyme) normalisiert, es unterdrückt die Expression der Protein-Disulfid-Isomerase, ein Protein, das mit abnormen Wachstum der vaskulären glatten Muskulatur zusammenhängt.

---

<sup>28</sup> Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) aktiviert polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren (B[a]P) u.a. Umweltgifte zu ihren ultimativen kanzerogenen Metaboliten [[http://www.charite.de/forschungsberichte/FOB\\_2003-2005/deutsch/PJ/PJ11713.html](http://www.charite.de/forschungsberichte/FOB_2003-2005/deutsch/PJ/PJ11713.html) (08.02.2010)]

Vitamin C beeinflusst auch den Stoffwechsel von Elastin. Elastin ist in die Entwicklung der Gefäße einbezogen, auch bei Fehlentwicklungen wie der diskreten fibrozellulären Stenose der Aorta, der Koronararterien und Arteria Carotis und auch der peripheren Arterien. Diese Menschen sind für CVD gefährdet. Man konnte zeigen, dass Vitamin C die Elastin mRNA Stabilität herabsetzt und die Kollagen-I-RNA zu einem großen Teil stabilisiert. Die Transskription von Elastin wurde um 72% herabgesetzt, hier handelte es sich um eine in vitro Studie von vaskulären glatten Muskelzellen und Zusatz von Ascorbat [Ricciarelli 2000].

### 6.5.5 Vitamin D

Neues Wissen um die biologische und klinische Bedeutung des Steroidhormons  $1\alpha, 25\text{-dihydroxy-Vitamin D}_3$  [ $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] und seinen Rezeptor Vitamin D Rezeptor (VDR), haben signifikant zu guter Knochengesundheit beigetragen.

Neuere Studien haben gezeigt, dass das Wirkungsspektrum dieses Hormons viel größer ist als primär angenommen. Man sieht das an der Gewebeverteilung des VDR's, vom Mediator für die Calcium Homöostase in Darm, Knochen, Niere und Parathyroidea, erstreckt sich der Wirkungsbereich des pluripotenten Hormons nun auf weitere fünf physiologische Gebiete, wo eindeutig zusätzliche biologische Aktionen des Hormons identifiziert worden sind:

- Das adaptive Immunsystem
- Das angeborene Immunsystem
- Insulinsekretion durch die Zellen des Pankreas
- Fetale und Gehirnentwicklung
- Blutdruckregulation und vielfältige Wirkung auf die Herzfunktion [Norman 2008].

Die zirkulierenden Metaboliten des Vitamin D binden mit hoher Affinität an das Vitamin D Bindungsprotein (VDB), das ist ein einzelkettiges Serumglykoprotein,

welches vom Gc-Gen kodiert wird, einem Mitglied des multigenetischen Clusters, welcher Albumin und  $\alpha$  Fetoprotein inkludieren und auf Chromosom 4q11-q13 liegt.

Die Aktionen des Steroidhormons D3 werden über genomische und nicht genomische Wege mediiert. Zum Ersteren zählt die Bindung an den VDR, dieser gehört zur Gruppe der Steroid-Thyroid-Hormonrezeptor Superfamilie. Zum nicht genomischen Stoffwechselweg gehört die Bindung an den vermeintlichen Membran-VitaminD-Rezeptor, dieser soll für die rasch eintretenden Effekte des Vitamin D verantwortlich sein.

Das VDR Gen ist beim Menschen auf Chromosom 12q12-q14 lokalisiert. Es sind verschiedene häufige Polymorphismen im VDR Gen gefunden worden, von denen berichtet wurde, dass sie mit einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Phänotypen in verschiedenen Rassen assoziiert werden. Dazu zählen Variationen, die sich in allen Geweben, in denen es VDR Rezeptoren beim Menschen gibt, auswirken. So wurde auch für die Schwere der CVD ein Zusammenhang mit Polymorphismen gefunden.

Vitamin D besitzt antiproliferative, antioxidative und antiangiogene Eigenschaften. Diese Eigenschaften sind für chronische Erkrankungen wie CVD positiv einzureihen. Epidemiologische Studien haben eine inverse Relation zwischen den zirkulierenden Spiegel an 25-Hydroxyvitamin D und dem Risiko von CVD festgestellt, ebenso für PAVK. Es gibt einige Studien die den Polymorphismus des VDR in Zusammenhang mit CVD untersucht haben. In einer Studie an 41 holländischen Patienten, die KHK wurde mittels Angiographie verifiziert, wurde eine Assoziation zwischen der BsmI Variante und der Schwere der Koronarsklerose festgestellt. In dieser Studie hatten jene Patienten, die schwere Koronarstenosen hatten, den bb Genotyp.

In einer Studie an 293 deutschen Patienten wurde unter ähnlichen Vorgaben und Untersuchungsmethoden ein gegenteiliges Resultat festgestellt: BB Träger hatten

gegenüber bb Trägern das höhere Risiko, heterozygote Träger lagen im Mittelfeld.

Es gibt jedoch eine Kohortenstudie mit einer Teilnehmerzahl von 3441 Probanden, die weder die eine noch die andere Studie bestätigen konnte. Auch hier wurde die Schwere der KHK mittels Koronarangiographie verifiziert.

Es wurden noch andere kardiovaskuläre Phänotypen untersucht und eine Assoziation zwischen dem B Allel der BsmI Variante mit Verkalkung der Aortenklappe festgestellt. [Reis 2005].

Bei einer 2009 durchgeführten Studie an über 583 Patienten mit Aortenklappenstenose auf Grund von Verkalkung (Kontrollgruppe war ebenso groß) wurden drei Genvarianten des VDR analysiert: VDR rs1544410, VDR rs1073810 und PTH rs6254. Zusätzlich wurden auch Genvarianten des Parathormons (PTH) als Kandidatengen bestimmt. Man konnte in der Gruppe mit dem PTH AA Genotyp eine höhere Prävalenz für Aortenklappenstenose finden, das VDR Gen war statistisch nicht signifikant [Schmitz 2009].

Ebenfalls 2009 wurde eine Studie durchgeführt, die den Zusammenhang von kongestivem Herzfehler mit Hypertension untersuchte und einen Zusammenhang mit genetischen Variationen im Vitamin D Signalweg finden wollte. Es wurden fünf Kandidatengene gewählt: CYP27B1, CYP24A1, VDR, REN und ACE. Die Teilnehmer waren in drei Gruppen geteilt: 205 Probanden mit kongestivem Herzfehler und Hypertension, 206 die nur an Bluthochdruck litten und 206 Kontrollen. Bei dieser Studie konnte im Zusammenhang mit Bluthochdruck ein SNP im Kandidatengen CYP27B1 gefunden werden, daraus wurde der Schluss gezogen, dass diese genetische Variation in der Vitamin D Biosynthese mit einem erhöhten Risiko für kongestiven Herzfehler einhergeht [Wilke 2009].

Mit zunehmender Niereninsuffizienz steigt der Phosphatspiegel an, der Calciumspiegel sinkt und Parathormon wird in großen Mengen ausgeschüttet. Man ist bei Dialysepatienten dazu übergegangen, diese Veränderung des



Stoffwechsels mit einem D Vitamin oder Analogon zu behandeln und so die vermehrte Ausschüttung von Calcitonin zu senken. Viele dieser Patienten entwickeln ein kardiorenales Syndrom. In den letzten 10 Jahren hat man herausgefunden, dass eine chronische Niereninsuffizienz ein kardialer Risikofaktor ist. Wenn die glomeruläre Filtrationsrate unter 60ml/min. sinkt, findet man stark vermehrt kardiovaskulärer Ereignisse, die nicht durch vorgegebene Schädigungen wie Atherosklerose verursacht werden. Der Begriff kardiorenales Syndrom wurde von Claudio Ronco geprägt [Ketteler 2010].

Es wird in fünf Untergruppen geteilt:

- Akutes kardiorenales Syndrom
- Chronisches kardiorenales Syndrom
- Akutes renokardiales Syndrom
- Chronisch renokardiales Syndrom
- Sekundäres kardiorenales Syndrom

[Ronco 2008].

2008 wurde eine Studie durchgeführt, die feststellen sollte, ob erhöhte Phosphatspiegel nur bei niereninsuffizienten Patienten mit erhöhtem kardialen Risiko einhergingen oder ob auch in der normalen Bevölkerung ein Zusammenhang bestünde. Es wurde eine Assoziation zwischen Phosphatspiegel im Blut und der Dicke der Arteria Carotis Intima-Media-Dicke (cIMT) hergestellt. Es wurden 13.340 Probanden herangezogen, die keine Zeichen von CVD hatten und auch renal gesund waren. Das Ergebnis der Studie besagte, dass Serumphosphat positiv mit der cIMT Messung korrelierte, unabhängig von traditionellen Risikofaktoren [Onufrak 2008].

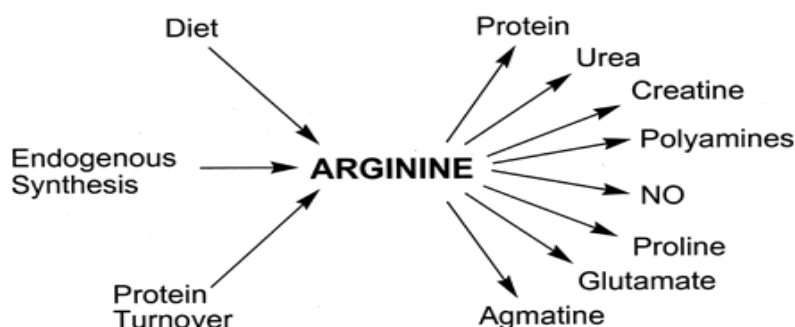
## 6.6 L-Arginin

L-Arginin ist eine semiessentielle Aminosäure, welche die Produktion von NO anhebt und dadurch die endotheliale Funktion verbessert. Dies konnte anhand von epidemiologischen Studien ebenso wie in klinischen Versuchen, sowohl bei Patienten, die an CVD leiden, als auch bei gesunden Probanden bestätigt werden [Allison 2001].

Endotheliale Dysfunktion könnte einerseits auf das Fehlen dieser Aminosäure, Erkrankungen oder aber auf endogene L-Arginin Inhibitoren zurückgeführt werden, weiters hat man in den letzten Jahren auch genetische Ursachen für eine verminderte Verfügbarkeit von L-Arginin gefunden [Yang 2007]. Die Frage, ob die Versorgung mit L-Arginin einen Schlüssel zur Optimierung endothelialer Funktion darstellen könnte, war bis vor wenigen Jahren nicht beantwortet [Goumas 2001].

### 6.6.1 Stoffwechselweg L-Arginin und ADMA (asymmetrisches dimethyliertes Arginin)

Arginin ist eine semiessentielle Aminosäure und weist im Rahmen des Stoffwechsels eine große metabolische Vielfalt auf. Sie dient als Vorläufer für die Synthese von Harnstoff, Nitroxid, Polyaminen, Prolin, Glutamat, Kreatin und Agmatin.

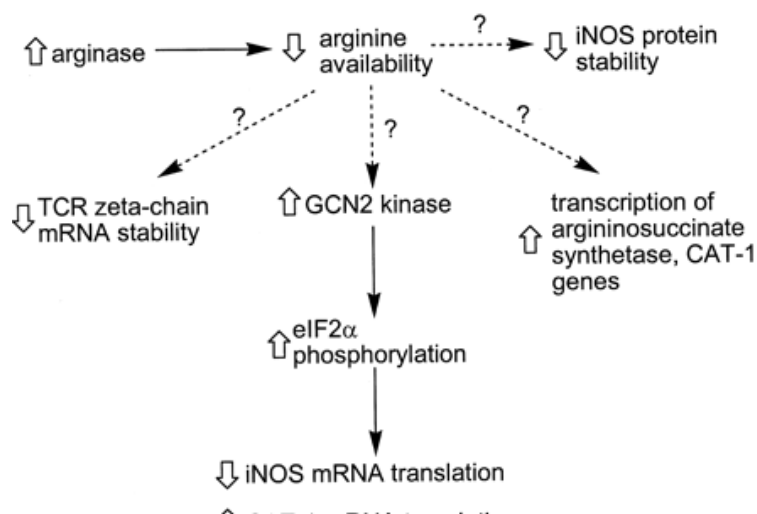


**Abbildung 19:** Quellen und Metabolismus des Arginins  
Putrescin, Spermin und Spermidin sind unter Polyaminen zusammengefasst, NO= Nitroxid [Morris 2006].

Die Metabolisierung des Arginin ist komplex, kompliziert und teilweise noch nicht vollends geklärt, sowohl die im Körper als jene auf zellulärer Ebene. Es ist allerdings erwiesen, dass die begrenzte Verfügbarkeit dieser Aminosäure einen Einfluss auf die Expression spezifischer Gene hat, die selbst am Arginin-Metabolismus beteiligt sind [Morris 2006].

Verminderte Verfügbarkeit an Arginin, wie es bei katabolischem Stress vorkommt, kann vorzugsweise die Expression spezifischer Proteine verändern, und zwar mehr als man als Konsequenz auf einen Wechsel der globalen Proteinsynthese erwartet.

Vor einigen Jahren wurde die Expression verschiedener Gene, bedingt durch Mangel an der Verfügbarkeit von L-Arginin, welche aus vermehrter Arginase Aktivität resultieren kann, festgestellt. Dies beinhaltet induzierbare NOS, den kationischen Aminosäuretransporter 1(CAT-1)) und die Zeta-Kette des T-Zell Rezeptors. Mangel an Arginin bewirkt reduzierte Expression von iNOS und der Zeta-Kette der T-Zellrezeptoren, CAT-1 wird vermehrt exprimiert. Diese Veränderungen geschehen durch reduzierte translationale Aktivität der iNOS mRNA, verminderte Stabilität von NOS Proteinen, verminderte Halbwertszeit der mRNA, die die Zeta-Kette der T-Zell-Rezeptoren kodiert und in einem Anstieg der Transkription des CAT (cationic amino acid transporter)-1 Gen und Anstieg der Translation der CAT-1 mRNA resultiert.



**Abbildung 20:** Effekte verminderter Arginin Verfügbarkeit

geblockte Pfeile markieren Anstieg oder Abfall der angezeigten Eigenschaften, Stoffwechselwege, die noch nicht belegt worden sind, werden mit gepunkteten Linien und Fragezeichen angezeigt: CAT-1: kationischer Aminosäuretransporter-, eIF2 $\alpha$ : eukaryotischer Initiationsfaktor 2 $\alpha$ , GCN2-Kinase<sup>29</sup>, iNOS: induzierbare NOS mRNA: messenger RNA, TCR: T-Zell Rezeptor [Morris 2006].

Die veränderte translationale Effizienz der iNOS und CAT-1 sind eine Folge der gesteigerten Aktivität der GCN2-Kinase, die eIF2 $\alpha$  phosphoryliert und damit dessen Aktivität vermindert. Im Fall der iNOS mRNA, kann der Beginn der Translation unter diesen Bedingungen völlig zum Stillstand kommen, im Fall von CAT-1mRNA kommt es zu einer gesteigerten Expression von CAT-1 [Morris 2006].

L-Arginin ist das Substrat für die Produktion von NO; eNOS, das katalysierende Enzym, nimmt L-Arginin aus dem Plasma über einen Y-Rezeptor auf und wandelt die Aminosäure in NO und Citrullin um, L-Citrullin wird zu L-Arginin zurückgeführt [Hecker 1990].

Andererseits entsteht aus Argininresten in methylierten Proteinen (die Methylgruppe stammt von S-Adenosylmethionin) durch Hydrolyse der endogene NO-Synthase-Inhibitor ADMA. Diese Aminosäure ist ein kompetitiver Inhibitor der eNOS (auch neuronale NOS werden inhibiert). Erhöhte ADMA

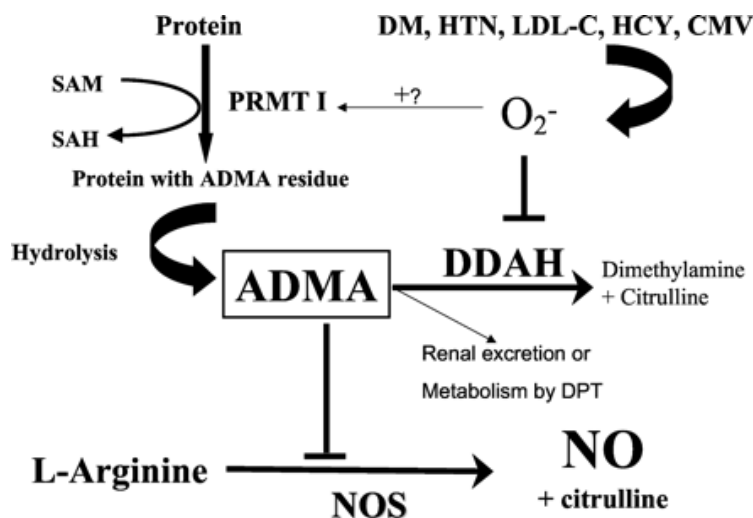
<sup>29</sup> GCN2, eine überall exprimierte Proteinkinase, die eIF2 $\alpha$  phosphoryliert als Antwort auf intrazellulären Mangel an Aminosäuren

Spiegel wurden zuerst bei Patienten mit Niereninsuffizienz festgestellt, vor allem deshalb, weil ADMA zum Teil renal ausgeschieden wird [Vallance 1992].

Ferner wurden in prospektiven Studien erhöhte ADMA Plasmaspiegel bei vielen Krankheitsbildern wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Atherosklerose, chronischer renal und cardialer Insuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, koronarer Herzerkrankung und Diabetes mellitus gefunden [Böger 2004, Dentz 2006].

ADMA, welches nicht über die Niere ausgeschieden wird (etwa 85 % werden verstoffwechselt), erfährt einen Abbau über die Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase I (DDAHI) und der Isoform DDAH2, welche in endothelialen Zellen vorkommt [Bode-Böger 2007].

### 6.6.2 Mechanismen, durch die ADMA erhöht wird



**Abbildung 21:** Biochemischer Stoffwechselweg der Synthese

Elimination und des Abbaus von ADMA: ADMA wird aus methylierten Argininresten in Proteinen gebildet, die Reaktion wird von PRMTs (Protein Arginine N-Methyltransferase) katalysiert, die eine Methylgruppe von S-adenosyl-L-Methionin (SAM) auf jedes Guanidinstickstoff eines Argininrestes transferieren. Aus dieser Reaktion geht ein methyliertes Argininderivat hervor (ein Protein, das ADMA enthält und S-adenosyl-L-Homocystein (SAH)). Durch Hydrolyse der methylierten Proteine wird ADMA abgegeben. ADMA ist ein kompetitiver Hemmer der eNOS. Methylarginin wird in den Harn abgegeben und teilweise durch das Enzym Dimethylarginin-Pyruvat-Aminotransferase (DPT) zu  $\alpha$ -Ketosäuren metabolisiert. ADMA wird zum größten Teil über den

Abbau durch DDAH metabolisiert. Das Enzym DDAH hydrolisiert ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin. Erkrankungen, bei denen ADMA erhöht ist: DM: Diabetes mellitus, HTN: Hypertonie, LDL-C: LDL Cholesterin, HCY: Hyperhomocysteinämie, CMV: Zytomegalie Virus [Cooke 2004].

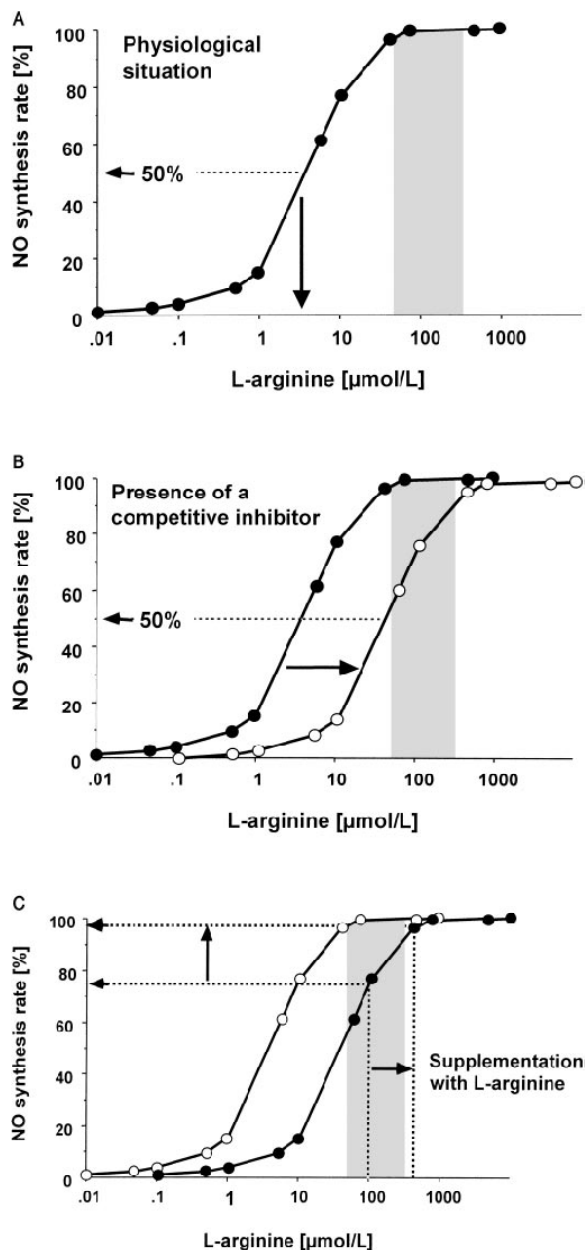
### 6.6.3 Das L-Arginin Paradoxon

Sowohl akute als auch chronische Supplementierung mit L-Arginin verbessert die Endothelfunktion in Bezug auf Dilatation der Gefäße und Herabsetzung der Thrombo- und Monozytenadhäsion; die Proliferation der glatten Muskulatur wird reduziert. Diese Beobachtungen, die durch in vivo Studien gemacht wurden, decken sich nicht mit in vitro Versuchen, was die Dilatation der Gefäße betrifft [Böger 2004]. Experimentell wurden geklonte, gereinigte eNOS in einem zellfreien Medium mit den optimalen Konzentrationen aller Kofaktoren versetzt, dabei fand man heraus, dass die Michaelis Menten Konstante ( $K_m$ ) für das Enzym bei etwa  $3\mu\text{mol/L}$  liegt [Cooke 2004]. Im Gegensatz dazu sind die zirkulierenden Mengen an L-Arginin bei gesunden wie auch kardiovaskulär erkrankten Menschen zwischen  $40 - 100\mu\text{mol/L}$ , das ergibt eine 15-30 mal höhere Menge als die  $K_m$  für eNOS. Auf Grund dieser Daten könnte man annehmen, dass die physiologischen L-Arginin Mengen für die eNOS in ausreichender Menge vorhanden sind. Man nennt diese Diskrepanz das L-Arginin-Paradox [Böger 2004].

Die Lösung für dieses Phänomen könnte auch mit dem Enzym Arginase in Zusammenhang gebracht werden. Dieses Enzym wandelt Arginin in Ornithin und Harnstoff um. In Tierversuchen konnte man durch erhöhte Arginasespiegel eine endotheliale Dysfunktion auslösen, auch bei älteren Tieren fand man erhöhte Arginase Spiegel. Ein anderes Modell sieht die Ursache für reduzierte L-Arginin Spiegel in höheren oxidierten LDL- und Lysophosphatidylcholin Spiegeln.

Durch diese Stoffe wird die Aufnahme von L-Arginin in die Endothelzelle vermindert. Die Tatsache, dass L-Argininsubstitution bei Hypercholesterinämie erfolgreich eingesetzt werden kann, beruht auf dieser Erkenntnis. Bei vermehrtem Angebot an L-Arginin kommt es durch kompetitive Hemmung

anderer Aminosäuren an den Y-Transportern zur vermehrten Aufnahme von L-Arginin in die Zelle. Dadurch ist auch die Verbesserung der endothelialen Funktion bei L-Arginin Supplementierung bei hypercholesterinämischen Patienten zu erklären.



**Abbildung 22:** L-Arginin ist das Substrat von NOS

Die enzymatische Kinetik der eNOS wurde biochemisch in vitro bestimmt. Die Daten zeigen, dass physiologische Plasma-L-Argininkonzentrationen in einer Höhe vorliegen (schattierte Fläche), die die Michaelis-Menten Konstante

Km für das Enzym bei weitem übersteigt, 50% der maximalen Enzymaktivität ist angezeigt. (Abb.A) Bei Vorliegen eines kompetitiven Inhibitors der eNOS wird die Konzentrations/Antwortkurve für L-Arginin nach rechts verschoben, sodass der steile Anstieg der Kurve in den Bereich der physiologischen L-Argininkonzentration kommt. (Abb.B) Unter solchen Bedingungen können sogar kleine Veränderungen in der L-Argininkonzentration merkliche Veränderungen in der eNOS Aktivität bewirken. Supplementierung mit L-Arginin erhöhen die eNOS Aktivität. (Abb.C) [Böger 2004].

Die Hemmung von eNOS durch ADMA als Ursache für endotheliale Dysfunktion wurde erstmals von Vallance (1992) beschrieben. Wenn man ADMA bei Gesunden infundiert, kommt es vorübergehend zu einer Reduktion des Cardiac Outputs<sup>30</sup> und einer verminderten Nierenperfusion. Der systemische vaskuläre Widerstand wird erhöht, der Blutdruck steigt an. Diese Veränderungen der hämodynamischen Parameter sind konkordant mit der Menge an infundierter ADMA Lösung/Zeit.

Gesunde Menschen produzieren täglich 60 mg ADMA, 10 mg davon werden renal ausgeschieden. Wie schon erwähnt, wird ADMA über DDAH metabolisiert, man nimmt heute an, dass durch verminderte Aktivität dieses Enzyms der ADMA Spiegel ansteigt. Einfluss auf die vermehrte Bildung von DDAH haben: oxidiertes LDL, Zytokine, Hyperhomozysteinämie, Hyperglykämie, Infektionen z.B. Cytomegalie-Virus, hohe Dosen von Erythropoietin. Wenn man die ideale Ratio von ADMA zu L-Arginin wüsste, könnte man gezielt vaskulärer endothelialer Dysfunktion bei Krankheiten, die mit erhöhten ADMA-Spiegeln einhergehen, durch Substitution mit L-Arginin entgegensteuern. L-Arginin würde ADMA ersetzen und die physiologische Ratio von L-Arginin/ADMA wieder herstellen. Das Problem liegt allerdings in der Bestimmbarkeit der L-Arginin/ADMA Ratio.

Die Bestimmung der Menge von L-Arginin und ADMA im menschlichen Blut stößt bei der blutchemischen Analyse auf erhebliche Schwierigkeiten, zum Beispiel können erniedrigte Argininspiegel durch hämolytisches Plasma, das durch die Arginasetätigkeit der Erythrozyten bedingt ist, auftreten. Die korrekte

---

<sup>30</sup> Die Blutmenge, die das Herz in einer Minute fördert.



simultane Bestimmung von L-Arginin, ADMA und der Ratio L-Arginin/ADMA fehlt daher bei den meisten klinischen Studien [Bode-Böger 2007].

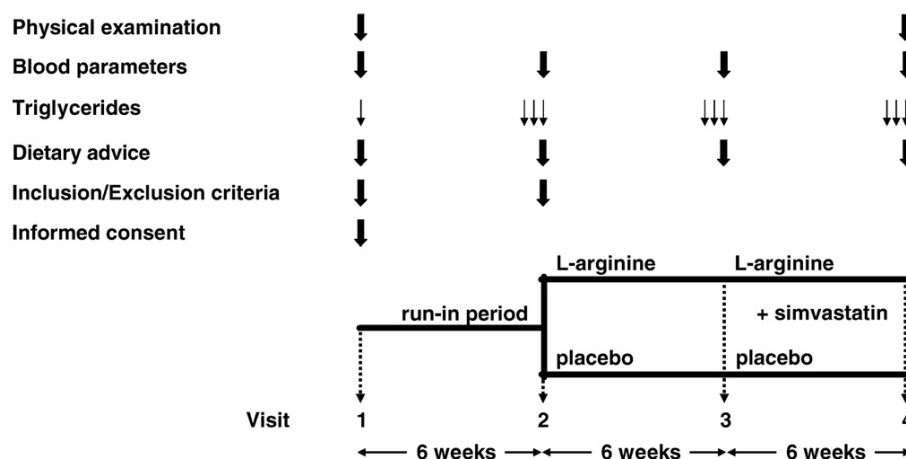
#### **6.6.4 Studien in der letzten Zeit**

Wie so häufig, kann man Studien auf Grund unterschiedlicher Studiendesigns sehr schlecht miteinander vergleichen, in vielen Fällen führen eine geringe Zahl an Probanden sowie eine Inkongruenz der Studie und Studienteilnehmer unter manchen anderen Fehlerquellen zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen. Bisherige Substitutionsstudien, bei denen L-Arginin als Monotherapeutikum verabreicht wurde, ob oral oder intravenös, bei gesunden oder kardiovaskulär erkrankten Menschen, sind in Bezug auf eine eindeutige Aussage nur bedingt zu gebrauchen. Außerdem sind die Stoffwechselwege des L-Arginins noch nicht vollständig geklärt, womit eine weitere Fehlerquelle vorhanden ist. Bei Kombinationsstudien ist die positive Wirkung bei der Substitution von L-Arginin wesentlich deutlicher zu erkennen.

An der Medizinischen Universitätsklinik in Hamburg am Institut für experimentelle Medizin und experimenteller und klinischen Pharmakologie wurde eine Studie über die Wirkung von Simvastatin<sup>31</sup> mit Placebo, bzw. Simvastatin in Kombination mit L-Arginin und L-Arginin als Monotherapie durchgeführt und die Wirkung auf die Serum-Triglyceridspiegel der Studienteilnehmer geprüft. Das Konzept des Studiendesigns war in meinen Augen gut aufgebaut:

---

<sup>31</sup> Ist ein Statin: ein Medikament, welches über eine Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase eine Senkung der Serumkonzentration von Cholesterin führt. [ <http://flexikon.doccheck.com/Statin> (15.03.2010)]



**Abbildung 23:** Studiendesign L-Arginin

Anlaufzeit von 6 Wochen ohne lipidsenkende Medikamente nur lipidsenkende Diät, randomisierte Zuteilung der Patienten zu einer der beiden Gruppen: eine Gruppe erhielt L-Arginin 3g/die, die andere Gruppe erhielt Placebo in einem Doppelblindversuch. Nach 6 Wochen wurde Simvastatin(20mg/die) zugefügt. Triglyceride wurden an 3 verschiedenen Tagen.

Die Studie hatte nur 33 Teilnehmer, durch das Design und die Zielsetzung - die Patienten hatten zu Beginn der Studie alle erhöhte Triglyceridspiegel, der Triglyceridspiegel war auch als Endpunkt der Studie angesetzt- erhielt man wesentlich aussagekräftigere Resultate als bei vorangegangenen Studien, wo diese Faktoren nicht berücksichtigt worden waren. L-Arginin alleine (3g/die) konnte den Triglyceridspiegel nicht senken, die Kombination von Simvastatin (20 mg/die) mit L-Arginin ergab einen wesentlich besseren senkenden Effekt (36% im Gegensatz zu 16%) auf die Serumlipide als Simvastatin mit Placebo. Es gibt Studien bei gesunden Freiwilligen und Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz, die eine Senkung der Triglyceridspiegel mit L-Arginin als Monotherapie zeigen, diese Studienteilnehmer hatten einen primär normalen Triglyceridspiegel. Im Gegensatz dazu konnte man in Studien bei Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder postmenopausalen gesunden Frauen keine Senkung der Lipidspiegel mit L-Arginin Substitution alleine feststellen.

In dieser Studie wurden 3g L-Arginin täglich substituiert, was gegenüber anderen Studien relativ niedrig ist, die Dosen bis zu 7g L-Arginin/die verabreichten

[Schulze 2009]. Da die Dosierung bei der Supplementierung von L-Arginin insoweit problematisch ist, da bereits im Darm durch Arginasetätigkeit ein Abbau erfolgt, versucht man einerseits, L-Arginin Substituierung durch L-Citrullin zu ersetzen, bzw. hat man bei einer Dosierung von 1,5g L-Arginin festgestellt, dass ein ausreichender Wirkspiegel erreicht werden kann [Schwedhelm 2008].

Der positive Effekt einer Kombination von Statinen und L-Arginin Supplementierung wurde auch in Bezug auf die Erweiterung von Gefäßen (dies wurde an der Arteria brachialis gemessen) bei Kranken mit hohen ADMA Spiegeln festgestellt. Bei dieser Studie war der Effekt des Statins als Monotherapie bei Patienten mit hohen ADMA Spiegeln minimal. Dies beweist, dass ADMA, selbst wenn die eNOS Expression gesteigert wird, die NO Produktion kompetitiv verhindert, erst bei Gabe von L-Arginin, dem natürlichen Substrat, wird dieser Mechanismus durchbrochen [Böger 2007].

Der Mechanismus, mit dem Statine das Herz Kreislaufsystem - abgesehen von der Wirkung auf Lipide - schützen, ist noch nicht geklärt. Die vasoaktiven und angiogenetischen Fähigkeiten dieser Substanzen und die Rolle der eNOS, solche Wirkungen herbeizuführen, sind für viele Wissenschaftler ein interessantes Thema. Es konnte bei Mäusen mit normalem Cholesterinspiegel gezeigt werden, dass Statine die Größe von cerebralen Insulten verringerten und die neurologische Morbidität senkten, was durch einen vermehrten Blutfluss zustande kam. Man vermutet, dass dies durch vermehrte eNOS Expression auf der Ebene der RNA ausgelöst wurde. Experimente, bei denen die Transkription angehalten wurde, zeigten eine durch Statine induzierte Verlängerung der eNOS mRNA Halbwertszeit um fast die Hälfte [Tai 2004].

An Watanabe homozygoten Hasen<sup>32</sup> konnte gezeigt werden, dass sich die atheromatösen Plaques an den Gefäßen auf eine Kombinationstherapie von Statin

---

<sup>32</sup> Hasen mit vererbter Hypercholesterinämie, dienen als Modell für Atherosklerose, homozygote bilden Plaques bereits mit 5 Monaten [Rasmussen 2007]

mit Arginin besser zurückbildeten als mit einer Monotherapie mit Statinen. Es bildeten sich 21 % aller Plaques zurück, die im Gebiet der abdominellen Aorta sogar um 44% [Rasmussen 2007].

Im Bereich der Studien über die Genetik der Hypertonie hat man einen neuen Polymorphismus, der zur Hypertension und zur endothelialen Dysfunktion beiträgt, gefunden. Verschiedenste Studien auf dem Gebiet der Hypertonie haben bei normotensiven Zwillingen, deren Eltern an essentieller Hypertonie litten, festgestellt, daß sie eine beeinträchtigte endotheliale Funktion haben. In dieser Studie fand man heraus, daß der Grund ein reduzierter Arginintransport ist. Der wahrscheinlich verantwortliche molekulare Mechanismus dafür könnte in der Entdeckung eines neuen Polymorphismus in der 3-UTR<sup>33</sup> des L-Arginin Transporter Gens SLC7A liegen. Das abweichende Allel geht mit einer erhöhten Expression von SLC7A1<sup>34</sup> einher, wodurch zum Teil die pathophysiologischen Veränderungen erklärt werden können. SLC7A ist ein Transporter für Arginin und Lysin in Säugetierzellen. Die Expression dieses Transporters kann durch verschiedene Stimuli verändert werden, wie Zellproliferation, Wachstumsfaktoren, Zytokine, gewisse Hormone, Mikro RNA, Nahrungsmittel, Rauchen und zellulärem Stress. Durch den C/T Polymorphismus in der 3\_UTR Region des Arginintransporters, bewirkt das Minor T Allel, dass die Expression des Reporter Gens abgeschwächt wird und die Kapazität, DNA-Proteinkomplexe zu bilden, vermindert ist. Diese SNP Formation wurde bei 13,3% der Hypertoniker dieser Studie im Gegensatz zu 7,6% der Normotensiven gefunden. Um diese Studie zu bekräftigen wurde eine transgene Maus gezüchtet, die den L-Arginintransporter vermehrt exprimieren.

Diese Mäuse zeigten eine verstärkte Reaktion in Form von Weitstellung der Gefäße auf Reize mit Azetylcholin, verglichen mit Wildtyp Mäusen. Die aortalen

---

<sup>33</sup> 3' UTR In der GenetiKs ist 3' UTR eine spezieller Abschnitt der Messenger RNA (mRNA)  
[http://pheads.com/3%27\\_UTR.html](http://pheads.com/3%27_UTR.html) (23.11.2009)

<sup>34</sup> früher "CAT-1"Transporter; Chromosom 13q12-q14

Endothelzellen der transgenen Mäuse zeigten eine vermehrte Produktion von NO verglichen mit den Wildtyp Mäusen [Yang 2007].

Yang hat in einer neuen Studie, die dasselbe Thema beinhaltet, herausgefunden, dass das Minor T Allel von SLC7A1 mit einem langen 3-UTR Abschnitt verbunden ist, während das Major Allel von SLC7A1 von einem kurzen 3-UTR Abschnitt begleitet wird.

Reporter Gene, die den langen 3-UTR Abschnitt haben, zeigen eine geringere Genexpression als jene, die die kurze 3-UTR Region beinhalten und zwar unabhängig von der Allelstruktur. Daraus schließt der Autor, dass eine alternative Polyadenylierung und/oder miRNA<sup>35</sup> Bindungsstelle eine Rolle bei der Genexpression spielen. Er hält es für möglich, dass die Bindung von miRNA 122 an 3-UTR eine Verminderung der Genexpression bewirkt, was erniedrigte Spiegel von SLC7A1 zur Folge hat und zur Dysfunktion des Endothels bei Hypertonikern beitragen kann [Yang 2009].

Insgesamt kann man aus dem bisherigen Wissensstand schließen, dass L-Arginin Substitution bei endothelialer Dysfunktion einen positiven Stellenwert in der Behandlung einnimmt. Da der Stoffwechsel dieser Aminosäure sehr umfangreich ist und die molekularen Vorgänge noch nicht vollends aufgeklärt sind, ebenso wie der Metabolismus der Aminosäure in Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen, kann man derzeit kein gerechtfertigtes Urteil abgeben. Positiv zu bewerten ist die Tatsache, daß bislang noch keine Daten vorliegen, die auf eine schädliche Wirkung bei Substitution dieser Aminosäure hinweisen, die zeitlich limitierten Unverträglichkeitsreaktionen, die bei Infusion oder oraler Aufnahme auftreten, sind passager und reversibel. Interessant ist, dass es durchwegs positive Ergebnisse bei Studien in Zusammenhang mit der Aufnahme von Nüssen und CVD gibt und diese unter anderem vermehrt Arginin enthalten.

---

<sup>35</sup> Micro RNA: kleine RNA Moleküle, die im Genom von Pflanzen und Tieren kodiert sind. Sie regulieren multiple Gene, da hunderte von miRNA in höheren Eukaryoten vorhanden sind, ist das pPotential im regulatorischen Kreislauf der miRNA enorm groß.  
[[http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA/mirna\\_intro.html](http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA/mirna_intro.html) (12.03.2010)]



## 7 SCHLUSSBETRACHTUNG

Es wurden teilweise vielversprechende Ansätze gemacht, dazu gehören:

- das Human Genom-
- das HapMap Projekt
- die Entwicklung von Mikroarrays
- Proteomik
- Nanotechnologie
- hoch funktionelle sensitive Assays

Damit können die Regeln des Zusammenspiels in Geweben und Organen erforscht werden. Es gibt auch vielversprechende Arbeiten, die den molekularen Einfluss von Nährstoffen auf die Genetik der CVD anzeigen, wir sehen die Spitze des Eisbergs und wissen, dass noch Vieles im Dunkeln liegt.

Obwohl die derzeitige Beweislage durch experimentelle sowie beobachtende Studien über die Genetik der Ernährung noch nicht dort angelangt ist, wo man eine personalisierte ernährungsspezifische Empfehlung abgeben kann, die auf genetischen Fakten beruht, gibt es schon jetzt eine große Anzahl von SNPs, die die individuelle Antwort auf Ernährung anzeigen, sie beweisen, dass das Konzept von der Interaktion zwischen Genetik und Ernährung den Metabolismus im Körper bezogen auf CVD beeinflussen. Es ist vor allem wichtig, dass die vorangegangenen Studien durch Replikationstudien geprüft werden, dass kommende Studien ein korrektes Design aufweisen, genügend statistische Power haben und sorgfältig dem Geno- und Phänotyp Aufmerksamkeit schenken. Es müssen die potentiellen Mechanismen, die in das Wechselspiel Genetik-Ernährung involviert sind, erforscht werden, dazu müssen - wie in der Arbeit mehrfach erwähnt - Experten aus verschiedenen Gebieten zusammenarbeiten.

Die Entdeckung der Desoxiribonukleinsäuren liegt etwa 50 Jahre zurück. Bedenkt man, was von damals bis jetzt auf dem Gebiet der Genetik und dem Gebiet von Nutrigenomiks geschehen ist, so kann man berechtigt hoffen, dass die Zeitspanne von jetzt bis zur tatsächlichen persönlichen Empfehlung der Ernährung für den Einzelnen, der an CVD erkrankt, kürzer ist.





## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Aiello RJ et al.: Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1518–1525.

Alberts, Bray, Hopkin et al.: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 3. Auflage, Wiley-Vch Verlag GmbH

Allison A Brown, Hu Frank B: Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease; *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, Nr. 4, 673-686, April 2001

Andrew D. Johnson : Single-Nucleotide Polymorphism Bioinformatics, A Comprehensive Review of Resources; *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009;2:530-536, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.872010

Aulchenko Yurii S et al.: Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts *Nat Genet.* 2009 January ; 41(1): 47–55.

Bale B et al.: Biomarkers in nutritional epidemiology; *Public Health Nutrition* (2002), 5:821-827 Cambridge University

Barter Philip J. et al.: Targeting Cholesteryl Ester Transfer Protein for the Prevention and Management of Cardiovascular Disease; *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 47, No. 3, 2006

Bauernfeind Anja: Einfluss genetischer Varianten auf den Cholesterinstoffwechsel in einer mitteleuropäischen Bevölkerungsstichprobe; Dissertation Medizinischen Fakultät der Charité -Universitätsmedizin Berlin, 2006

Bergeron N et al.: Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Clin Invest* 1996;97: 65–72.

Bode-Böger Stefanie M., et al.:The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio Pharmacology & Therapeutics 114 (2007) 295–306,

Boerwinkle E et al.: Apolipoprotein E polymorphism influences postprandial retinyl palmitate but not triglyceride concentrations; Am J Hum Genet. 1994 February; 54(2): 341–360.

Böger Gerhild I. et al.:Asymmetric Dimethylarginine Determines the Improvement of Endothelium-Dependent Vasodilation by Simvastatin: Effect of Combination With Oral L-Arginine; Journal of the American College of Cardiology Vol. 49, No. 23, 2007

Böger Rainer H : Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric OxideSynthase, Explains the “L-Arginine Paradox” and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor1, Supl. The Journal of Nutrition 2004, S2842-S2847

Bolanos-Garcia Victor Martin et al.: On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins, Progress in Biophysics & Molecular Biology 83 (2003) 47–68

Bolz Steffen-Sebastian, Ulrich Pohl: Indomethacin enhances endothelial NO release-evidence for a role of PGI2 in the autocrine control of calcium-dependent autacoids production; Cardiovascular Research 36 (1997) 437-444

Borecki Ingrid B.: Contemporary Approaches to Gene Discovery: Progress Toward Personalized Medicine? Circulation: Cardiovascular Genetics. 2009; 2: 1-2

Brown Allison A: Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease; Am J Clin Nutr 2001;73:673–86.

Burmana Debika et al.: Relationship of the ApoE polymorphism to plasma lipid traits among South Asians, Chinese, and Europeans living in Canada, Atherosclerosis 203 (2009) 192–200

- Carole Rasmusen et al.: L-Arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits, *British Journal of Nutrition* (2007), 97:1083-1089
- Casas Juan P. et al.: Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease (*Circulation*. 2004;109:1359-1365.)
- Cassidy Andrea E et al.: Progression of Subclinical Coronary Atherosclerosis Does Obesity Make a Difference? *Circulation*. 2005;111:1877-1882
- Cooke John P: Asymmetrical Dimethylarginine The Über Marker? *Circulation*. 2004;109:1813-1818
- Creager Mark et al.: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I; *Circulation*. 2003;108:1527-1532
- Danesh John et al.: C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease ; *The New England Journal of Medicine*, April 1, 2004, vol. 350 no 14
- Davis Cindy et al.: Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges; *Acta pharmologica Sinica* 2007 September; 28 (9): 1262-1273
- De Grooth Greetje et al.: The cholesteryl ester transfer protein (CETP) TaqIB polymorphism in the cholesterol and recurrent events study: no interaction with the response to pravastatin therapy and no effects on cardiovascular outcome; *J Am Coll Cardiol*, 2004; 43:854-857,
- De Roos Baukje: Nutrition proteomics and biomarker discovery; *Expert Review of Proteomics*, August 2009, Vol. 6, No. 4, Pages 349-351
- Dehghan Abbas et al.: „Association of Novel Genetic Loci With Circulating Fibrinogen Levels. A Genome-Wide Association Study in 6 Population-Based Cohorts; *Circulation Cardiovascular Genetics*, January 2009
- Delles Christian et al.: The genetics of cardiovascular disease; *Cell Press* doi:10.1016/j.tem.2008.07.010

Demer LL, Tintut Y: Vascular Calcification, Pathobiology of a Multifaceted Disease; Circulation. 2008;117;2938-2948

Dentz Lena : Bedeutung des NO-Synthase-Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin als prädiktiver Marker für das perioperative kardiovaskuläre Risiko Dissertation : Universität Hamburg, FB Medizin, 2006 URN (NBN) : urn:nbn:de:gbv:18-31872

Di Francesco Luigia, Licia Totani et.al.:Induction of Prostacyclin by Steady Laminar Shear Stress Suppresses Tumor Necrosis Factor- Biosynthesis via Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells, Circulation Research. 2009;104:506-513

Ding Keyue et al.: Genome-Wide Association Studies for Atherosclerotic Vascular Disease and Its Risk Factors; Circ Cardiovasc Genet 2009;2;63-72

Doevendans Pieter A. et al.: Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis; International Journal of Cardiology, Volume 80, Issues 2-3, September-October 2001, Pages 161-172, doi:10.3945/ajcn.2009.26736R

Dominiczak Anna F et al.: Cardiovascular Genomics and Oxidative Stress; Hypertension. 2005;45:636-642

Dreves Kathrin: Genetische Variation im Exon 7 des endothelialen NO-Synthase-Gens und ihre Bedeutung für Präeklampsie, Dissertation an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2009

Edzard Schwedhelm et al.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism; British Journal of Clinical Pharmacology, Volume 65, Issue 1, Pages 51-59, 2008

Elliott P. et al.: Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease; JAMA. 2009 Jul 1;302(1):92-3

Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial Dysfunction; J Am Soc Nephrol 15: 1983 – 1992, 2004

Engeli Stefan et al.: Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Hypertension. 2005;45:356

Erdmann Jeanette et al.: New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3; Nat Genet. 2009 March ; 41(3): 280–282.

Félétou M, et al.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? EDHF: an update; lin Sci (Lond). 2009 Jul 16;117(4):139-55.

Fogg-Johnson Nancy et al.: Moving Forward with; foodtechnology, 08.07  
www.ift.org

Friedrich Schulze et al.: L-Arginine enhances the triglyceride-lowering effect of simvastatin in patients with elevated plasma triglycerides; Nutrition Research 29 (2009) 291–297

Füllbeck Melanie: In silico und in vitro Screening von Proteinliganden zur Apoptoseinduktion; Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin 2007

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; Nature. 1980 Nov 27; 288 (5789):373-6.

Gibney Michael J et al.: Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges; Am J Clin Nutr 2005;82; 497-503

Gluckman Peter et al.: Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease; NEJM Volume 359:61-73, July 3, 2008Number 1

Goumas George, Tentolouris Costas et al.:Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases, Volume 154, Issue 2, Pages 255-267 (1 February 2001), Atherosclerosis

Guttmacher Alan E et al.: Genomic medicine; N Engl J Med 2003;349:60-72.

Hallbach Jürgen: Klinische Chemie für den Einstieg; 2006, Georg Thieme Verlag

- Hanefeld M et al.: Geschichte und Definition(en) des metabolischen Syndroms; Der Internist ; Springer, Volume 48, Number 2 / Februar 2007
- Havsteen Bent H: The biochemistry and medical significance of the flavonoids; Pharmacology & Therapeutics 96 (2002) 67– 202
- Ilyin SE,et al.: Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. Trends Biotechnol.2004;22:411– 416
- Jaffe A: Cardiovascular biomarkers: The state of the art in 2006; Clinica Chimica Acta 381 (2007) 9–13
- Jenab Mazda et al.: Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons; Hum Genet (2009) 125:507–525
- Jensen Majken K et al.: Obesity, Behavioral Lifestyle Factors, and Risk of Acute Coronary Events; Circulation. 2008;117:3062-3069.
- Jeppe Zacho et al.: Genetically Elevated C-Reactive Protein and Ischemic Vascular Disease; NEJM, Volume 359:1897-1908, October 30, 2008
- Joven Jorge: Monocyte chemoattractant protein-; Category: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology; 14 August 2008; [http://www.scitopics.com/Monocyte\\_chemoattractant\\_protein\\_1.html](http://www.scitopics.com/Monocyte_chemoattractant_protein_1.html)
- Kaliora A.C. et al.: Dietary antioxidants in preventing atherogenesis, Atherosclerosis 187 (2006) 1–17
- Kane Modou Oumy et al.: Role of gender and estrogen receptors in the rat aorta endothelium-dependent relaxation to red wine polyphenols; Vascular Pharmacology 51 (2009) 140–146
- Kaput Jim: Diet-Disease Gene Interactions; Nutrition 20:26-31, 2004
- Kaput Jim: et al.: Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era; Physiol Genomics 16: 166–177, 2004;
- Kaput Jim: Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era; Physiol. Genomics 16: 166-177, 2004

Ketteler M. et al. : Cardiorenal syndrome; 2010 Nephrologe , pp. 1-7, article in press, Springer Verlag

Khakpour et al.: Lipoprotein-associated phospholipase A2: An independent predictor of cardiovascular risk and a novel target for immunomodulation therapy, Cardiology in Review, Volume 17, Issue 5, September 2009, Pages 222-229

Khymenets Olha et al.: Mononuclear Cell Transcriptome Response after Sustained Virgin Olive Oil Consumption in Humans: An Exploratory Nutrigenomics Study; OMICS: A Journal of Integrative Biology. Feb 2009, Vol. 13, No. 1: 1-6

Kim Ji et al.: Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with coronary artery disease and markers of oxidative stress: a case-control study; American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 88, No. 3, 630-637, September 2008

Kjaergaard SC et al.: In-hospital outcome for diabetic patients with acute myocardial infarction in the thrombolytic era; Scand Cardiovasc J. 1999;33(3):166-70

Kluger M. et al.: Apoprotein A-V: An important regulator of triglyceride metabolism; J Inherit Metab Dis (2008) 31:281–288

Koenig E et al.: Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Adds to Risk Prediction of Incident Coronary Events by C-Reactive Protein in Apparently Healthy Middle-Aged Men From the General Population Results From the 14-Year Follow-Up of a Large Cohort From Southern Germany; Circulation. 2004;110:1903-1908.

König Jürgen: Das Metabolom: Ernährungsstatus, Metabolismus, Metaboliten, Emerging Focus Nutrigenomis, Vorlesungsunterlagen WS 2009/10

Köntopp Franziska: Bedeutung des Promotorpolymorphismus G-50T des Genes CYP 2J2 als genetischer Prädispositionsfaktor zur Entstehung der koronaren Herzkrankheit; Inauguraldissertation Ruhr-Universität Bochum, 2004

Kris-Etherton Penny M. et al.: Antioxidant Vitamin Supplements and Cardiovascular Disease; *Circulation*. 2004;110:637-641.

Kruger Warren et al.: Polymorphisms in the CBS Gene Associated with Decreased Risk of Coronary Artery Disease and Increased Responsiveness to Total Homocysteine Lowering by Folic Acid, *Molecular Genetics and Metabolism* 70, 53–60 (2000)

Kussmann Martin et al.: OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health; *Journal of Biotechnology* 124 (2006) 758–787

Landmesser U, Hornig B et al.: Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II27-33

Libby Peter, Pierre Theroux: Pathophysiology of Coronary Artery Disease; *Circulation* 2005;111, 3481-3488

Löffler, Petrides, Heinrich: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Verlag 2007

López-Miranda Jose et al.: The Influence of Lipoprotein Lipase Gene Variation on Postprandial Lipoprotein Metabolism; *the Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 89, No. 9 4721-4728

Loscalzo Joseph: The Evolution of the Discipline of Vascular Biology: From Systems Physiology to Molecular Biology to Molecular Systems, *Circulation Research* 2003; 93; 583-585

Lucock Mark: Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes; *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 121–138 (2000)

Lüscher Thomas et al.: Diabetes and Vascular Disease Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part II; *Circulation*. 2003;108:1655-1661



- Malinowska Anna et al.: Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism–related enzymes and risk for cardiovascular disease; Nutrition Research 29 (2009) 685–695
- Marko-Varga G et al.: Discovery of biomarker candidates within disease by protein profiling: principles and concepts. J Proteome Res. 2005;4:1200 –1212.
- Mc Nulty Helene et al.: Riboflavin Lowers Homocysteine in Individuals Homozygous for the MTHFR 677C3T Polymorphism; Circulation. 2006;113:74-80
- McDermot David et al.: tCCL2 Polymorphisms Are Associated With Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels and Myocardial Infarction in the Framingham Heart Study; Circulation. 2005;112:1113-1120
- Morris, Jr Sidney M : Arginine: beyond protein American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 83, No. 2, 508S-512S, February 2006
- Mündlein A.et al.:Einfluss von DNA-Variationen auf die koronare Herzerkrankung Journal für Kardiologie 2008; 15(11-12), 342-346;
- Murthy Ven et al.: Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene; Pharmacology & Therapeutics, Volume 70, Issue 2, 1996, Pages 101-135;
- Musunuru Kiran et al.: HapMap and Mapping Genes for Cardiovascular Disease; Circulation: Cardiovascular Genetics. 2008;1:66-71
- Mutch David M. et al.: Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of Nutrition; the FASEB Journal Vol. 19 October 2005 , 1601-1616
- Nabel E.: Cardiovascular Disease, NEJM, Volume 349:60-72, July 3, 2003, Number 1
- Nakamura YukikoK.et al.: VitaminE-modulated gene expression associated with ROS generation; Journal of Functional Foods 1(2009)241 – 252

Narkiewicz Krzysztof: Obesity and hypertension—the issue is more complex than we thought; *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006 21(2):264-267; doi:10.1093/ndt/gfi290

Neuzil Jiri et al.: The role of vitamin E in atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease; *Atherosclerosis* Volume 157, Issue 2, August 2001, Pages 257-283

Nilius, Sigrid Maria: Regulation des Prostacyclin-Rezeptors in humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten, Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2001 nutrition related health; *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 795 – 804

Norman Anthony W. : From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health; *Am J Clin Nutr* 2008;88(suppl):491S–9S.

Onufrak Stephen J et al.: Phosphorus levels are associated with subclinical atherosclerosis in the general population *Atherosclerosis*, Volume 199, Issue 2, August 2008, Pages 424-431

Ordovas Jose et al.: Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein–TaqIB Polymorphism With Variations in Lipoprotein Subclasses and Coronary Heart Disease Risk : The Framingham Study *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1323-1329

Ordovas Jose M.: Nutrigenetics, Plasma Lipids, and Cardiovascular Risk; *J Am Diet Assoc.* 2006;106:1074-1081

Ordovas Jose M: Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention1–4; *Am J Clin Nutr* 2009;89(suppl):1509S–17S.

Ordovas Jose M: Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 83, No. 2, 443S-446S, February 2006

Ordovas Jose: XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, June 18-22, 2006

Ordovas, Jose et al.: The APOE locus and the pharmacogenetics of lipid response; Current Opinion in Lipidology: April 2002 - Volume 13 - Issue 2 - pp 113-117

Ostertag LM et al.: Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies; Mol Nutr Food Res. 2010 Jan;54(1):60-81

Packard Rene R.S., Peter Libby: Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction; Clinical Chemistry 54:1; 24-28; 2008

Paul M Ridker et al.: Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein; NEJM, Volume 359:2195-2207, November 20, 2008

Perez-Martinez Pablo et al.: Influence of genetic factors in the modulation of postprandial lipemia; Atherosclerosis Supplements 9 (2008) 49–55

Pollex Rebecca et al.: Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease; Circulation 2007;115;3130-3138

Prasad Abhiram, MD, MRCP; Jianhui Zhu et al: Predisposition to Atherosclerosis by Infections, Role of Endothelial Dysfunction; Circulation. 2002;106:184.

Ramachandran S. Vasan: Biomarkers of Cardiovascular Disease, Molecular Basis and Practical Considerations; Circulation 2006;113;2335-2362

Reaven Gerald: Why a Cluster is Truly a Cluster: Insulin Resistance and Cardiovascular Disease; Clinical Chemistry 54:5 785–787 (2008)

Reinbold Michael: Induktion von Apoptose durch ungesättigte Fettsäuren in Zellen des kardiovaskulären Systems; Dissertation, Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

Reis A.F.: Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence; Diabetes Metab 2005;31:318-325

Ricciarelli Roberta et al.: Vitamin E Reduces the Uptake of Oxidized LDL by Inhibiting CD36 Scavenger Receptor Expression in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells; Circulation. 2000;102:82.

Rip Jaap et al.: Serum Lipoprotein Lipase Concentration and Risk for Future Coronary Artery Disease The EPIC-Norfolk Prospective Population Study; , Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:637-642

Robert Robertson, Michael Gollob: Molecular Cardiology and Genetics in the 21st Century – A Primer; Curr.Probl Cardiol, October 2006

Ronco Claudio et al.: Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong; Intensive Care Medicine, Volume 34, Number 5 / Mai 2008

Ros Emilio: Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease; Am J Clin Nutr 89: 1649S-1656S, 2009. First published March 25, 2009;

Rösen P :Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose Journal für Kardiologie 2002; 9(12), 556-562 ;

Rueben Alexandra: Bedeutung von Epoxyeicosatriensäuren für das endotheliale Calciumsignalling; Dissertation, Johan Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main; 2006

Saiki RK, S Scharf et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science 1985 ,Vol 230, Issue 4732, 1350-1354

- Sattler Alexander: In-vivo Kinetik der Apolipoproteine B-100 und A-I bei Patienten mit Hyperlipidämie unter dem Einfluss des Lipidsenkers Lifibrol; Dissertation, medizinische Fakultät der Philipps-Universität Marburg, 2002
- Schaefer Ernst J: Lipoproteins, nutrition and heart disease; Am J Clin Nutr 2002; 75:191 – 212
- Schmitz F. et al.: Parathyroid hormone gene variant and calcific aortic stenosis; J Heart Valve Dis. 2009 May;18(3):262-7.
- Schmitz G: Biomarker: Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung; Schattauer Verlag 2008
- Shaham Oded et al.: Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity; Molecular Systems Biology 2008, 4; Article number 214;
- Spieker Lukas: HDL-Cholesterin bei Atherosklerose –zu wenig des Guten; Schweiz Med Forum Nr. 39 24. September 2003
- Stengård J. H et al.: Variation in 5' Promoter Region of the APOE gene Contributes to Predicting Ischemic Heart Disease (IHD) in the Population at Large: the Copenhagen City Heart Study; Ann Hum Genet. 2007 November; 71(Pt 6): 762–771
- Stoclet Jean-Claude et al.: Vascular protection by dietary polyphenols; European Journal of Pharmacology 500 (2004) 299– 313
- Stoneking Mark: Single nucleotide Polymorphisms: From the evolutionary past; Nature|Vol 409 | 15 February 2001
- Tai Sharon C.; Robb G. Brett et al.: Endothelial Nitric Oxide Synthase A New Paradigm for Gene Regulation in the Injured Blood Vessel; Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004;24:405

Talmud PJ et al.: LPL promoter –93T/G transition influences fasting and postprandial plasma triglycerides response in African-Americans and Hispanics. *J Lipid Res* 1998;39:1189–96.

The International SNP Map Working Group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms; *Nature* 409, 928-933 (15 February 2001)

Vallance P, Leone A, et al.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure; *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):572-5.

van Ommen Ben et al: Challenging homeostasis to define biomarkers for nutrition related health; *Molecular Nutrition & Food Research*, Volume 53 Issue 7, Pages 795–804, Published Online: 10 Jun 2009

Vita Joseph A. and Joseph Loscalzo: Shouldering the Risk Factor Burden: Infection, Atherosclerosis, and the Vascular Endothelium; *Circulation* 2002, 106;164-166

Vita Joseph A: Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function; *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):292S–7S.

Wain Louise V et al.: Genomic copy number variation, human health, and disease; *Lancet* 2009; 374: 340–50

Waldner Maximilian: Die Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation, Dissertation, medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007

Wang Hong et al.: Lipoprotein lipase: from gene to obesity; *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E271-E288, 2009

Watkins H, Farrall M.: Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress; *Nat Rev Genet*. 2006 Mar;7 (3):163-73

Weggemans Rianne M. et al.: Apoprotein E genotype and the response of serum cholesterol to dietary fat, cholesterol and cafestol; *Atherosclerosis* 154 (2001) 547–555

Weintraub MS et al.: Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571–7.

Wilke RA et al.: Genetic variation in CYP27B1 is associated with congestive heart failure in patients with hypertension; *Pharmacogenomics*. 2009 Nov;10(11):1789-97.

Wilson DE et al.: Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest* 1990;86:735–50.

Yamada Yoshiji et al.: Prediction of the Risk of Myocardial Infarction from Polymorphisms in Candidate Genes; *NEJM* Volume 347:1916-1923, December 12, 2002 Number 24

Yang Zhiyong et al.: Mechanistic insights into the link between a polymorphism of the 3'UTR of the SLC7A1 gene and hypertension , 2009 *Human Mutation* 30 (3), pp. 328-333

Yang Zhiyong: ; Identification of a Novel Polymorphism in the 3'UTR of the L-Arginine Transporter Gene SLC7A1 Contribution to Hypertension and Endothelial Dysfunction; *Circulation* 2007;115;1269-1274

Zeisel Steven H et al: Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline; *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 86, No. 3, 542-548, September 2007





## 9 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ursachen für kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) sind multifaktoriell, sie entstehen durch Gen – Umwelt Interaktionen. Der Fortschritt in der Wissenschaft ermöglicht es, den molekularen Ansatz, der den Mechanismen und die Funktionsweisen von Zellen und den Aufgaben bestimmter Zellbestandteile zugrunde liegt, zu erkennen und die Rolle genetischer Steuerungsmechanismen zu erklären.

Der Einfluss von Nährstoffen auf die Ausprägung der CVD, besonders in Bezug auf das Gefäßendothel, wird in dieser Arbeit, soweit es bisher vorliegt, dargestellt. Da groß angelegte Studien über einzelne Nahrungsbestandteile und ihren Einfluss auf die CVD keine eindeutigen Ergebnisse gebracht haben, werden die diversen Single Nukleotid-Polymorphismen beleuchtet, welche für die individuelle Reaktion auf Nahrungszufuhr von Bedeutung sind und darauf hinweisen, wie wichtig die personalisierte Ernährung des Einzelnen ist.

Es werden die Grundzüge der Genetik der CVD erörtert, die Faktoren, welche zu CVD führen, auf die Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und für ernährungsspezifische Studien wird eingegangen, die Grundlagen von Nutrigenomik erklärt.

An Hand der detaillierten Betrachtung von Fettstoffwechsel, den B-Vitaminen, Antioxidantien und L-Arginin wird versucht, die Veränderung des genetischen Codes bei kardiovaskulären Erkrankungen zu zeigen.



## 10 SUMMARY

The reasons for cardiovascular diseases are manifold, resulting from interactions between the environment the patients live in and their genetic disposition.

Modern science gives us the tools to recognize the molecular pattern basic to the mechanisms of certain cells and their way of functioning; furthermore it helps us to develop a deeper knowledge of the allocation of tasks among special cell-parts and to explain how genetic control mechanisms work.

The paper in hand focusses on the impact of nutrients on the formation of CVD, specially on the endothelial wall as displayed in today's secondary material. As large-scale studies on individual food-components and their impact on CVD could offer ambiguous results only, the present study centers on the various Single Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) and the way they influence a patient's individual reaction to food supply thus emphasizing the importance of personalized nutrition.

The paper in hand discusses basic principles of CVD-genetics and the main reasons for its outbreak. It refers to the biomarkers for cardiovascular diseases and on nutritional studies referring to CVD. Furthermore it explains the principles of nutrigenomics.

Offering a detailed discussion of the exchange of fatty acid metabolism, B-vitamines and vitamine D, antioxidants and L-arginin it outlines the change of the genetic code in cardiovascular diseases.



## 11 CURRICULUM VITAE

**Name:** Dr. Elisabeth Kastl-Killinger  
**Geburtsdatum:** 2.7.1951, in Wien  
**Adresse :** 1130 Wien, Gobergasse 34/2/12  
Telefonnr.: 8798231 oder 06765405107  
**Staatsbürgerschaft:** Österreich  
**Familienstand:** ledig, ein Sohn  
**Sozialversicherungsnummer:** 4236 020751

**Education:** Volksschule 1957 - 1961  
Gymnasium 1961 – 1969  
Medizinstudium an der Universität Wien:  
September 1969 – November 1974  
Promotion: 22.11.1974  
Facharzt für Anästhesiologie: 1981  
Facharzt für allgemeine Medizin: 1981

1975 - 1999 Ausbildung zum Facharzt für Anästhesie mit zusätzlichen Schwerpunkten wie Beatmung und Ernährung von Intensivpatienten und allgemeine Medizin, anschließend als Facharzt und Oberarzt bei der Gemeinde Wien tätig, Leitung der postoperativen herzchirurgischen Intensivstation und ausbildender Oberarzt für Herzanästhesie, zahlreiche Auslandsaufenthalte zur Weiterbildung im New York Blood Center (Blood Banking), Sloan Kettering Memorial Hospitals (Antibody Lab.), Mount Sinai Hospital (Cardiothoracic Intensive Care Unit), alle New York und Children's Hospital Boston.

seit 1999 als Wohnsitzarzt für Anästhesie tätig.

Wissenschaftliche Vorträge auf dem Gebiet des Acute Respiratory Distress Syndroms (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Tuberkulose; Essen 1984)

Wissenschaftliche Arbeiten und Vorträge über das Atriale Natriuretische Peptid (European Association of Cardiothoracic Anesthesiologists, Eacta 90 in Wien, European Academy of Anaesthesiology , EAA 1992 Paris)

Gutachterliche Tätigkeit für den Karger Verlag betreffend Atrial Natriuretic Peptide

Gründungsmitglied der Eacta (European Association of Cardiothoracic Anaesthesiologists)

Mitglied der AKE (österreichische Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung)

Mitglied der ÖGARI (österreichische Gesellschaft für Anästhesie, Reanimation und Intensivtherapie)

Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien beginnend Oktober 2005, derzeit Einreichung des Prüfungspasses für den 2. Abschnitt mit dem Diplomarbeitsthema: „die molekulare Wirkung ausgewählter Nährstoffe auf die Genetik der kardiovaskulären Erkrankungen“

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Diplomarbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Arbeit angegeben habe. Dementsprechend sind alle Textstellen, die wörtlich oder nur sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden als solche kenntlich gemacht.“

Wien, am 14.5.2010

Dr. Elisabeth Kastl-Killinger